



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

Thiago Cesar Martins

**EFEITOS DO TREINAMENTO DE EXERCÍCIO EXCÊNTRICO
NA DOR NEUROPÁTICA E REGENERAÇÃO NERVOSA
PERIFÉRICA EM CAMUNDONGOS**

Florianópolis
2015

Thiago Cesar Martins

**EFEITOS DO TREINAMENTO DE EXERCÍCIO EXCÊNTRICO
NA DOR NEUROPÁTICA E REGENERAÇÃO NERVOSA
PERIFÉRICA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Neurociências da Universidade
Federal de Santa Catarina como
requisito para obtenção do título de
Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Adair
Roberto Soares dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel
Fernandes Martins

Florianópolis
2015

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

Martins, Thiago

Efeitos do treinamento de exercício excêntrico na dor neuropática e regeneração nervosa periférica em camundongos / Thiago Martins ; orientador, Adair Roberto Soares dos Santos ; coorientador, Daniel Fernandes Martins. - Florianópolis, SC, 2015.

123 p.

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

Inclui referências

1. Neurociências. 2. Neurociências. 3. Dor neuropática. 4. Regeneração nervosa periférica. 5. Exercício excêntrico. I. Roberto Soares dos Santos, Adair. II. Fernandes Martins, Daniel. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. IV. Título.

THIAGO CESAR MARTINS

**“EFEITOS DO TREINAMENTO DE EXERCÍCIO
EXCÊNTRICO NA DOR NEUROPÁTICA E
REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA EM
CAMUNDONGOS”**


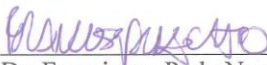

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 26 de fevereiro de 2015.



Prof. Rodrigo Bairy Leal
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:


Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Orientador – UFSC
Dr. Francisney P. do Nascimento
Membro – UFSC
Prof. Jocemar Ilha
Membro externo à UFSC
Prof. Luiz Guilherme A. Guglielmo
Membro - UFSC

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelas oportunidades e objetivos alcançados.

Agradeço também aos meus familiares e minha esposa Ana Paula Batisti pelo grande amor, apoio e compreensão neste período e sempre. Amo muito vocês!

Ao Prof. Daniel Martins e sua esposa Leidiane os quais pude acompanhar desde minha iniciação científica e aprender tanto. Em especial ao Prof. Daniel pela confiança, paciência, parceria, conhecimentos compartilhados e o qual me possibilitaram grandes oportunidades que contribuíram para minha formação. Toda a sua ajuda e ensinamentos jamais serão esquecidos.

Ao Prof. Adair Roberto Soares dos Santos que “assinou em baixo” e acreditou em nossa proposta desde o início. Assim, me possibilitou cursar o mestrado acadêmico. Muito grato!

Aos amigos que fiz neste período, os quais compartilhamos momentos de alegria, paciência, parceria, compartilhamento, muito trabalho, e trabalho, e trabalho, já citei trabalho? E claro, conhecimento! Estes parceiros jamais esquecerei.

Aos amigos que me apoiaram desde a preparação para a prova da Neuro e compartilhando excelentes momentos, “né” Catharina e Rene? E claro ao apoio durante estes dois anos de experimentos. Agradecimento ao Edson Acioly pela ajuda direta com a esteira do LaNEx.

A todos os animais utilizados em nosso estudo. Sem estes, nenhum dos resultados existiriam.

Aos colaboradores do Programa de Pós Graduação em Neurociências envolvidos na minha formação e nos processos “burocráticos” como o nosso querido Nivaldinho.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para que este trabalho tenha sido concluído...

A todos vocês o meu sincero agradecimento,

MUITO OBRIGADO!!!

“Se vi mais longe, foi por estar de pé
sobre ombros de gigantes”.

(Isaac Newton)

RESUMO

A dor de origem neuropática é um problema crescente, crônico, com comorbidades físicas, psicológicas e de difícil tratamento. Ademais, terapias integrativas como os exercícios físicos têm sido estudados por seus efeitos moduladores na dor e atuarem como adjuvantes no seu tratamento. O Exercício Excêntrico (EE) caracterizado por ser realizado a baixo custo energético pode induzir aumento de massa e força muscular e melhora da mobilidade de indivíduos com baixa capacidade física. A execução de contrações excêntricas promove a síntese de fatores de crescimento em tecidos periféricos e no sistema nervoso central, assim há a possibilidade de auxiliar na regeneração nervosa periférica e hipotrofia muscular causada por lesões do sistema nervoso periférico. O presente estudo teve como objetivo verificar o efeito do treinamento de EE (executado a 6, 10 ou 14 m/min) sobre a hiperalgesia mecânica e térmica ao frio, na recuperação motora e funcional e na concentração de lactato sanguíneo, citocinas pró- e anti-inflamatórias, bem como sua influência sobre o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) em camundongos suíços machos submetidos ou não à cirurgia de esmagamento do nervo isquiático. Para isso, foram conduzidas avaliações de von Frey, acetona, índice estático e funcional do isquiático (IEI e IFI), força de preensão, histomorfometria do nervo isquiático e pesagem do tríceps sural durante a lesão nervosa (experimento crônico) e nove semanas após ao experimento. No 14º dia após a lesão também foi quantificado as concentrações de citocinas pró-, anti-inflamatórias e de IGF-1, bem como foi pesado o tríceps sural (experimento agudo). No experimento crônico foi observado que o EE reduziu a hiperalgesia mecânica e térmica ao frio. Efeito este que perdurou por até três horas para hiperalgesia mecânica e de pelo menos 24 horas sobre a hiperalgesia ao frio. O EE também acelerou o restabelecimento da função motora avaliada pelo IEI e IFI já ao 10º dia pós-operatório (PO), bem como da força de preensão ao 15º dia PO e do peso do tríceps sural nove semanas após a lesão nervosa. A análise morfométrica do nervo isquiático revelou o aumento da densidade de fibras e de forma discreta a área de tecido mielinizado após nove semanas de EE quando comparado com o grupo esmagado e não-exercitado. O EE reverteu parcialmente a redução de peso do tríceps sural decorrente da lesão nervosa no 14º dia PO, sendo este efeito dependente, pelo menos em parte, do aumento da concentração de IGF-1 no músculo e no nervo nos animais exercitados.

Além de reestabelecer o aumento e redução da concentração de fator de necrose tumoral- α e do antagonista do receptor de interleucina-1 no músculo no 14º dia PO, respectivamente. Assim, os resultados deste trabalho demonstram, pela primeira vez, que o emprego do EE foi efetivo em acelerar a recuperação sensório motora após lesão do nervo isquiático, pois o EE produziu analgesia e acelerou a regeneração nervosa, a recuperação motora e restaurou a força muscular e também aumentou a concentração de IGF-1 no músculo e no nervo isquiático esmagado, sugerindo que o efeito do EE depende da liberação do fator de crescimento IGF-1 que ocorre tanto no tecido nervoso quanto no tecido muscular. Entretanto, estudos futuros serão necessários para elucidar mecanismos de ação e a viabilidade deste treinamento como uma ferramenta na reabilitação de quadros de dor neuropática.

Palavras-chave: Dor neuropática, regeneração nervosa periférica, exercício físico, exercício excêntrico, recuperação funcional, camundongos.

ABSTRACT

Neuropathic pain is a growing, chronic, comorbid-associated disorder involving physical and psychological impairment. Because it is hard to treat integrative therapies like physical exercise reduce pain and has been proposed as a side treatment. Eccentric Exercise (EE) has been a tool for poor physical capacity people. Remarkable low energy cost, greater force and muscle mass are its features. This training seems to increase growth factors synthesis at nervous system which can help from nerve lesion-induced peripheral nerve regeneration and muscular atrophy. The aim of this study was to investigate whether the EE training (at 6, 10 or 14 m/min) impacts on mechanical and cold hyperalgesia, motor and functional recovery, blood lactate concentration, pro- and anti-inflammatory cytokines and role of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on recovery of male Swiss mice after sciatic nerve crush lesion or not. Assessments were conducted through nine (chronic experiment) or two weeks (acute experiment) after nerve lesion. A von Frey monofilament apparatus and a droplet (20 μ l) of acetone were used on hyperalgesia evaluation. The motor and sciatic nerve recovery were assessed by Sciatic Static and Functional (SSI and SFI) indexes, grip force method, triceps surae weight and histomorphometrical analysis. The level of pro-, anti-inflammatory cytokines and IGF-1 were measured through ELISA method. Chronic experiment results showed antihyperalgesic effect lasting three hours on von Frey and at least 24h on acetone tests. EE accelerated motor function restoration early at 10th, 15th PO and nine weeks after crush injury assessed by SSISFI, grip force and triceps surae weighing. The sciatic nerve morphometrical analysis revealed no increase in fiber density after EE protocol. Acute experiments of muscle weight, IGF-1 and cytokines dosage were carried out at 14th post operative day too. EE reversed partially nerve crush-induced muscle atrophy, raised significantly muscle and nerve IGF-1, muscle IL-1Ra and reduced TNF- α levels at 14th PO. It could suggest a real and relevant role of IGF-1 in muscle and nerve regenerative process accelerated by EE sessions. Thus the results presented here demonstrate that for the first time in the literature EE promoted sensorial and motor recovery after sciatic nerve crush. The evaluations showed improvements on hyperalgesia, motor and grip force recovery, nerve regeneration, muscle waste, muscle inflammatory status and nerve/muscle IGF-1 level. It could indicate a role of this growth factor on regenerating nerve and muscle after peripheral nerve lesion.

Nevertheless future studies to elucidate the action mechanism and feasibility of this training to rehab pain population are needed.

Keywords: Neuropathic pain, peripheral nerve regeneration, physical exercise, eccentric exercise, functional recovery, mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vias centrais da dor.....	26
Figura 2 - Sistemas descendentes de inibição da dor.....	29
Figura 3 - Anatomia dos nervos periféricos.....	32
Figura 4 - Classificação das lesões nervosas periféricas.....	33
Figura 5 - Degeneração e regeneração nervosa periférica após um evento lesivo.....	35
Figura 6 - IGF-1 pode agir como um hormônio.....	36
Figura 7 - Locais de expressão e ações dos IGFs no sistema sensorial e motor periférico.....	39
Figura 8 - Tipos de ações musculares.....	46
Figura 9 - Exposição cirúrgica do nervo isquiático direito e sutura da pele após procedimento.....	54
Figura 10 - Animais na esteira.....	56
Figura 11 - Lactímetro para o experimento de verificação da intensidade do EE em esteira.....	57
Figura 12 - Aparato utilizado e acomodação do animal para o teste com o monofilamento de von Frey.....	57
Figura 13 - Linha do tempo com as avaliações para hiperalgesia mecânica no experimento crônico.....	57
Figura 14 - Teste da acetona.....	59
Figura 15 - Linha do tempo das avaliações de hiperalgesia ao frio.....	59
Figura 16 - Linha do tempo das avaliações do IFI e IEI.....	61
Figura 17 - Pista de marcha de vidro e imagem utilizada para coleta.....	61
Figura 18 - Medidas para o cálculo dos índices.....	62
Figura 19 - <i>Grip Strength</i> - equipamento para mensuração da força de agarrar.....	63
Figura 20 - Linha do tempo das avaliações de <i>Grip Force</i> e pesagem do tríceps sural direito e esquerdo.....	63
Figura 21 - Execução de EE em esteira necessita de menor demanda fisiológica que a corrida em nível plano (0°).....	67
Figura 22 - Efeito de diferentes velocidades de EE sobre a hiperalgesia mecânica.....	69
Figura 23 - Efeito de diferentes velocidades de EE sobre a hiperalgesia ao frio.....	73
Figura 24 - Recuperação motora dos animais submetidos ao EE avaliada pelo IEI e IFI.....	75

Figura 25 - Efeito de diferentes velocidades de EE sobre a força de preensão.....	77
Figura 26 - Lesão compressiva do nervo isquiático induz perda de massa no Tríceps Sural.....	78
Figura 27 - EE recupera o peso do tríceps sural após esmagamento do nervo isquiático.....	80
Figura 28 - Histologia do nervo isquiático.....	79
Figura 29 - Análise morfométrica do nervo isquiático.....	82
Figura 30 - Efeito do EE sobre parâmetros morfométricos da regeneração nervosa.....	83
Figura 31 - Níveis de citocinas pró-inflamatórias 14 dias após a lesão nervosa.....	85
Figura 32 - Níveis de citocinas anti-inflamatórias 14 dias após a lesão nervosa.....	88
Figura 33 - Exercício excêntrico aumenta a concentração de IGF- 1.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos experimentais do experimento crônico.....	55
Tabela 2 - Grupos experimentais do experimento agudo.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG - 2-araçdonoilglicerol
AEA - Anandamida
Akt - Proteína Cinase B
AMPA - alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
AMPc - monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA - Análise de Variância
ASIC - Canal iônico sensível à acidez
ATP - Trifosfato de Adenosina
BDNF - Fator de Crescimento Derivado do Encéfalo
Ca²⁺ - Cálcio
CAM - Moléculas de Adesão Celular
CaMK - Cinase Dependente de Cálcio/Calmodulina
CB1 - Receptor Canabinóide-1
CGRP - Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
Cl⁻ - Cloreto
CREB - elemento de resposta ao monofosfato cíclico de adenosina
EE - Exercício Excêntrico
EE6 - Exercício Excêntrico a 6 m/min
EE10 - Exercício Excêntrico a 10 m/min
EE14 - Exercício Excêntrico a 14 m/min
ERK - Cinase Regulada por Sinal Extracelular
ERO - Espécies Reativas de Oxigênio
GABA - ácido gama aminobutírico
Gadd45a - Proteína alfa-induzida por dano de DNA e parada de crescimento
GDNF - Fator de Crescimento Derivado da Glia
GH - Hormônio do Crescimento
GSK - Glicogênio Sintase Cinase
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana adquirida
LOESER; TREEDE - Associação Internacional para Estudos da Dor
IEI - Índice Estático do Isquiático
IFI - Índice Funcional do Isquiático
IGF-1 - Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1
IGF-1Ec - Fator de Crescimento Mecânico (isoforma em humanos)
IGF-1Eb - Fator de Crescimento Mecânico (isoforma em roedores)
IGF-1R - Receptor de Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1
IGF-2 - Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-2

IGFBP - Proteína Ligante de Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IL-4 - Interleucina-4
IL-6 - Interleucina-6
IL-1 β - Interleucina-1 β
IL-1Ra - Antagonista do Receptor de Interleucina-1
IRS - Substrato do Receptor de Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1
K⁺ - Potássio
KCC2 - Canal Cotransportador de Potássio e Cloreto
kD - Quilodaltos
Km/h - Quilômetros por Hora
LaNex - Laboratório de Neurociência Experimental
MAPK - Proteína Cinase Ativada por Mitógeno
MCP-1 - Proteína Quimioatrativa de Macrófagos-1
MEC - Matrix Extracelular
Mg²⁺ - Magnésio
MGF - Fator de Crescimento Mecânico ou isoforma Ec (humanos) / Ed (ratos) do IGF-1
Na⁺ - Sódio
Na_v - Canal de Sódio Voltagem Dependente
NF- κ B - Fator Nuclear Kappa B
NGF - Fator de Crescimento Neural
NMDA - N-metil-D-aspartato
NMR - Núcleo Magno da Rafe
nNOS - Óxido Nítrico Sintase neuronal
NRGC - Núcleo Reticular Gigantocelular
 μ l - Microlitro
mM - Milimolar
 μ m - Micrómetro
m/min - Metros por Minuto
min - minutos
PI3K - Fosfatidil Inositol 3-Cinase
PKA - Proteína Cinase A
PKC - Proteína Cinase C
PO - Pós-operatório
RNAm - Ácido Ribonucleico Mensageiro
s - Segundos
SCPA - Substância Cinzenta Periaquedutal
SNC - Sistema Nervoso Central

SNP - Sistema Nervoso Periférico

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral- α

TRKB - Receptor Tirosinacina B

TRPA1 - receptor de potencial transiente tipo anquirina 1

TRPV1 - receptor de potencial transiente tipo vanilóide 1

TRPV2 - receptor de potencial transiente tipo vanilóide 2

TRPM8 - receptor de potencial transiente melastina 8

UNISUL - Universidade do Sul de Santa Catarina

UNIVALI - Universidade do Vale do Itajaí

OMS - Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 APRESENTAÇÃO	24
2 REFERENCIAL TEÓRICO	26
2.1 DOR	26
2.1.1 Dor neuropática periférica e degeneração walleriana	31
2.1.1.1 Degeneração Walleriana	33
2.2 FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA (IGF-1)	36
2.2.1 IGF-1 e Regeneração nervosa periférica	40
2.3 EXERCÍCIO FÍSICO	42
2.3.1 Exercício físico na redução da dor	43
2.3.2 Exercício físico e regeneração nervosa periférica	45
2.3.3 Exercício Excêntrico	47
3 OBJETIVOS	52
3.1 OBJETIVO GERAL	52
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
4 MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1 ANIMAIS	54
4.2 PROCEDIMENTO DE ESMAGAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO.....	54
4.3 PROTOCOLOS DE TREINAMENTO DE EXERCÍCIO EXCÊNTRICO	55
4.3.1 Experimento crônico	55
4.3.2 Experimentos agudos	56
4.3.3 Caracterização bioquímica do EE	57
4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS	58
4.4.1 Hiperalgesia mecânica	58
4.4.2 Hiperalgesia ao frio	60
4.4.3 Avaliação da recuperação funcional motora	61
4.4.3.1 Índice Funcional e Estático do Isquiático	61
4.4.3.2 Avaliação da força e trofismo muscular.....	63
4.5 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO NERVO ISQUIÁTICO	65
4.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	66

4.6.1 Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima - ELISA	66
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	66
5 RESULTADOS	68
5.1 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO EXERCÍCIO EXCÊNTRICO	68
5.2 EFEITO DO EXERCÍCIO EXCÊNTRICO NA HIPERALGESIA MECÂNICA	69
5.3 EFEITO DO EXERCÍCIO EXCÊNTRICO NA HIPERALGESIA AO FRIO	72
5.4 EFEITO DO EE EM DIFERENTES VELOCIDADES NA RECUPERAÇÃO FUNCIONAL MOTORA	75
5.4.1 Índice Funcional do Isquiático e Índice Estático do isquiático	75
5.4.2 Força de prensão	76
5.4.3 Peso muscular	79
5.5 EFEITO DO EE SOBRE A RECUPERAÇÃO MORFOLÓGICA DO NERVO ISQUIÁTICO	82
5.6 EFEITO DO EE EM DIFERENTES VELOCIDADES NA CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS	84
5.7 EFEITO DO EE EM DIFERENTES VELOCIDADES NA CONCENTRAÇÃO DE IGF-1	90
6 DISCUSSÃO	91
7 CONCLUSÕES	106
REFERÊNCIAS	108

1 INTRODUÇÃO

1.1 APRESENTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado foi desenvolvida, desde a concepção da ideia até seu desfecho, com base em observações laboratoriais, clínicas e de estudos anteriores desenvolvidos pelo grupo de estudos dos professores Daniel F. Martins e Adair R. S. Santos.

A motivação para estudos relacionados com o entendimento da dor e possíveis terapias “não-convencionais”, hoje melhor caracterizada como integrativa, é decorrente da complexidade no tratamento de dores crônicas e suas comorbidades. Assim, novos métodos que contribuam no tratamento e adaptado à especificidade de pacientes são bem vindos neste contexto.

Os exercícios físicos cíclicos como caminhadas ou mesmo corridas promovem certa ação analgésica, porém estes efeitos parecem ser dependentes da intensidade em que são realizados. Ademais, tem sido sugerido que maiores intensidades de exercício promovem maiores efeitos. O que seria um problema para indivíduos com síndromes dolorosas, pois muitas vezes possuem limitação de movimento e baixa aptidão física para executar certos treinamentos.

Neste sentido, recentemente algumas revisões têm reportado evidências a favor da utilização de contrações excêntricas dentro do contexto do treinamento, mas principalmente na reabilitação. Afinal, utilizar uma modalidade de exercício que exige menos em termos de dispêndio energético e ao mesmo tempo há maior estímulo mecânico no complexo músculo-tendíneo pode ser uma boa estratégia.

A realização de contrações musculares excêntricas ocorre constantemente em nosso cotidiano, entretanto um treinamento baseado neste tipo de contração e desenvolvido com o intuito de ser uma possível ferramenta na reabilitação de síndromes dolorosas e neuromusculares é algo que está chamando a atenção de clínicos e alguns cientistas atualmente. Ao mesmo tempo é preciso compreender as variáveis de treinamento e principalmente saber usá-las para o tratamento e treinamento físico.

Lesões agudas dos nervos periféricos estão frequentemente ligadas ao trauma, e implicam considerável incapacidade ao redor do mundo, principalmente nos países envolvidos em conflitos militares ou civis. Em tempos de paz, os acidentes automobilísticos e com máquinas industriais são as principais causas. Aproximadamente 3% de pacientes politraumatizados apresentam lesão dos nervos periféricos.

A dor neuropática é um importante problema de saúde associado às lesões traumáticas de nervos periféricos, além do uso extensivo dos serviços de saúde pelo grande número de pacientes, com altos custos orçamentários. Apesar da elevada prevalência e impacto negativo da dor neuropática, seu tratamento médico tem sido negligenciado. Alguns estudos mostraram que o manejo clínico da dor neuropática permanece insatisfatório, impossibilitando uma satisfação dos pacientes com o sono, capacidade de exercitar-se ou mesmo de executar tarefas caseiras (simples).

Na tentativa de fornecer subsídios técnico-científicos para contribuir com a reabilitação e tratamento da dor, este estudo verificou os impactos e benefícios que o exercício excêntrico realizado em esteira pode causar frente ao modelo animal de dor neuropática, caracterizado pela lesão por esmagamento do nervo isquiático. Assim, o exercício excêntrico pôde promover a redução de alguns sinais e sintomas presente nas neuropatias, como a redução da dor neuropática periférica, aumento da recuperação funcional e da massa magra após desnervação, sendo seus efeitos mediados provavelmente por fatores de crescimento e citocinas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DOR

A dor é caracterizada por ser uma experiência emocional e sensorial desagradável, que está associada a danos teciduais reais ou potenciais. Por este motivo, torna-se uma modalidade sensorial subjetiva em virtude das experiências de cada indivíduo (LOESER; TREEDE, 2008). Embora desagradável, a sensação de dor aguda é a modalidade sensorial que nos alerta sobre lesões. Assim, também é um importante sistema de controle homeostático, pois, perante tal estímulo buscamos cessá-lo, seja nos movendo para longe do possível agressor ou mesmo buscando o tratamento da lesão (KANDEL et al., 2013).

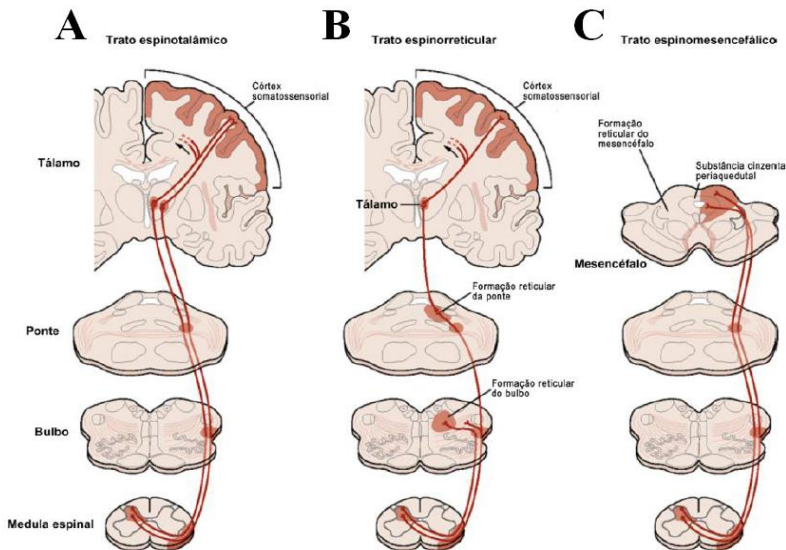
A dor causada por agentes estressores é mediada por nociceptores, que são proteínas receptoras especializadas na transdução de sinais nociceptivos de origem mecânica, química e/ou térmica. Estes receptores estão presentes em neurônios aferentes que inervam desde o tecido cutâneo, músculos, vasos e articulações até mesmo vísceras. Tais aferentes são classificados de acordo com os aspectos fisiomorfológicos de suas fibras ou axônios, assim os nociceptores estão presentes em fibras do tipo A δ (nociceção mecânica e térmica) que tem diâmetro médio e é levemente mielinizada e; fibras tipo C (nociceptores polimodais) que possuem pequeno diâmetro, nenhuma mielina e menor velocidade condução do potencial de ação que fibras A δ (JULIUS; BASBAUM, 2001; KANDEL et al., 2013).

Os nociceptores quando ativados por estímulos específicos, permitem a entrada de cátions como sódio (Na⁺) e cálcio (Ca²⁺) que tornam a superfície interna da membrana dos terminais sinápticos de aferentes nociceptivos mais positiva. Isto mobiliza a abertura de canais de Na⁺ voltagem dependente (Na_v1.7, 1.8, 1.9) permitindo que mais Na⁺ adentre a célula, amplificando o sinal e contribuindo assim na produção de um potencial de ação (PERTUSA et al., 2012; KANDEL et al., 2013; GANGADHARAN; KUNER, 2013).

Desta forma, os sinais nociceptivos são transduzidos e posteriormente conduzidos ao Sistema Nervoso Central (SNC) na forma de potencial de ação nos nervos. A entrada de estímulos nociceptivos se dá pelo ramo posterior da raiz dorsal dos nervos espinais, o qual conduz o estímulo às lâminas I, II, V e VII do corno posterior da medula espinal. Após uma sinapse excitatória (mediada por transmissores como glutamato e/ou neuropeptídios) com neurônios pós-sinápticos presentes nestas lâminas há comissura e ascendência de seus axônios para centros

superiores, como a formação reticular, mesencéfalo, tálamo e depois a diferentes partes do córtex cerebral relacionado à percepção, componentes discriminativos, emocionais e motores do estímulo doloroso (MOFFAT; RAE, 2010; KANDEL et al., 2013). Na figura 1 podemos observar as três principais vias do SNC associadas à dor.

Figura 1 - Vias centrais da dor.



Legenda: Em (A) observa-se uma importante via na transmissão nociceptiva, a via espinotalâmica, que tem origem nos neurônios aferentes secundários no corno posterior da medula espinal (lâminas I e V). As suas fibras cruzam a linha sagital mediana e ascendem projetando-se a núcleos talâmicos e realizando sinapses no próprio tálamo. Os neurônios talâmicos projetam-se por sua vez a diferentes áreas corticais. Na via espinoreticular (B) observa-se um trajeto semelhante à via espinotalâmica, no entanto nesta há projeções a formação reticular do bulbo. Em (C) o trato espinomesencefálico tem sua projeção dos aferentes secundários ao mesencéfalo. Dentre os núcleos em que essas fibras projetam-se estão a substância cinzenta periaquedutal (SCP), relacionada a modulação descendente da dor e o núcleo parabraquial que projeta fibras à amígdala, um núcleo do sistema límbico no lobo temporal do cérebro. Fonte: Adaptados de Kandel e colaboradores (2013).

A lesão tecidual em alguns casos pode estar associada a uma resposta inflamatória que é proveniente da liberação de prostaglandinas e bradicinina por células não-neuronais residentes (como queratinócitos

e fibroblastos) e liberação de substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) do aferente sensorial ao sítio da lesão. Estes mediadores promovem vasodilatação, aumento de permeabilidade dos vasos e extravasamento de plasma, permitindo a infiltração de células imunes envolvidas no processo de cicatrização como mastócitos, macrófagos e plaquetas. Porém tais células aumentam a produção e liberação de mediadores inflamatórios como prostaglandina, bradicinina, histamina, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de crescimento neural (NGF) aumentando a responsividade dos nociceptores caracterizando o quadro de sensibilização dolorosa periférica (BASBAUM et al., 2009; MOFFAT; RAE, 2010; KANDEL et al., 2013; GANGADHARAN; KUNER, 2013).

A ativação repetida de fibras C (dor crônica) ou mesmo uma lesão nervosa podem promover alteração da resposta da dor. A alodinia e a hiperalgesia são exemplos disso e estão associadas à sensibilização periférica e central (RINGKAMP; MEYER, 2008; STEEDS, 2013; KANDEL et al., 2013).

No caso da alodinia, que é caracterizada pela resposta de dor frente a um estímulo inócuo, como exemplo o leve toque na pele após queimadura de sol ou movimento de certas articulações em casos de artrite reumatóide. É descrito que a alodinia parece ser decorrente do brotamento anormal de fibras sensoriais do tipo A β (relacionadas ao tato discriminativo e propriocepção), presentes nas lâminas III e IV para lâminas mais superficiais do corno posterior da medula espinal, como a lâmina II. No entanto, este sintoma somente é presente quando há um estímulo periférico (STEEDS, 2013; KANDEL et al., 2013). Outra característica coexistente é a troca de fenótipo destas fibras, que passam a sintetizar e secretar substância P, a qual participa do aumento da responsividade dos neurônios no corno posterior da medula espinal (SANDKÜHLER, 2009).

Na hiperalgesia há uma resposta maior para um estímulo que já era nocivo. Este sintoma pode ocorrer no local lesionado, hiperalgesia primária, ou em sua vizinhança, hiperalgesia secundária. Os mecanismos por trás destas respostas alteradas são a sensibilização dos nociceptores periféricos por mediadores inflamatórios e também a sensibilização central (RINGKAMP; MEYER, 2008; STEEDS, 2013; KANDEL et al., 2013).

Tem sido demonstrado que os mecanismos fisiopatológicos da dor crônica são distintos da dor aguda por envolver componentes inflamatórios na lesão tecidual, infiltração de neutrófilos, mastócitos e macrófagos que liberam mediadores inflamatórios como eicosanoides,

interleucinas e neurotrofinas modificando o ambiente químico da fibra nervosa. Assim há o aumento de sua excitabilidade, que por sua vez libera glutamato (entre outros) que estimula os neurônios de projeção no corno posterior da medula espinal sensibilizando-os após estímulos consecutivos, ou lesão persistente. Também parece haver redução da inibição descendente e ativação de células da glia como astrócitos e microglia favorecendo a transmissão da dor aos centros supra-espinais (LOESER; TREEDE, 2008; BASBAUM et al., 2009).

Acredita-se que o principal mecanismo envolvido na dor crônica é a sensibilização central. Alguns eventos chave parecem ocorrer e assim há aumento da excitabilidade de vias nociceptivas. Um destes é o fenômeno chamado de *Wind-up* que é um aumento no número de descargas de potencial de ação (somação temporal) depois de repetida estimulação de fibras C e ocorre nos neurônios de projeção do corno posterior da medula espinal já nos primeiros segundos após surgir um estímulo nocivo contínuo. No entanto, este evento é de curto prazo e cessa com a retirada precoce do estímulo doloroso (SANDKÜHLER, 2009; STEEDS, 2013).

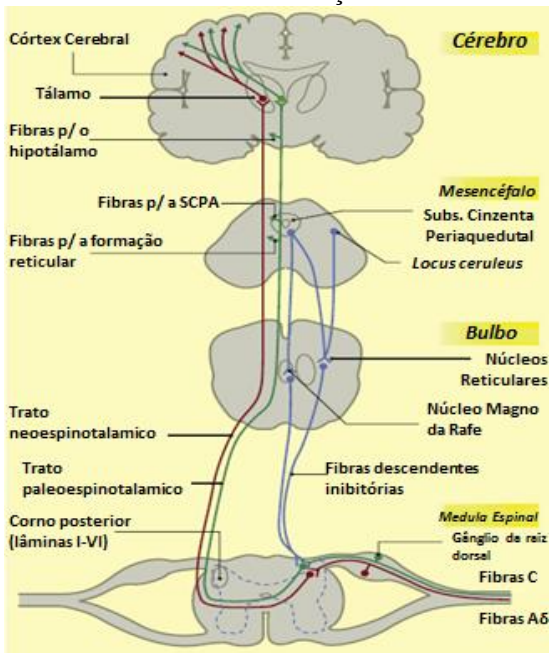
Outro fenômeno observado é a potenciação de longo prazo decorrente da estimulação repetida. Este processo é primeiramente dependente de glutamato, de seus receptores glutamatérgicos do tipo AMPA e NMDA, e do íon Ca^{2+} . A substância P e seus receptores neurocinina-1 e 2 também podem contribuir para aumento da atividade de receptores NMDA, receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR) e aumentar disponibilidade de Ca^{2+} no neurônio pós-sináptico (SANDKÜHLER, 2009).

Também proveniente do neurônio pré-sináptico são trifosfato de adenosina (ATP) e citocinas, dentre estas o TNF- α . Ambos contribuem para o processo de ativação da via p38 MAPK (proteínas cinase ativadas por mitógenos) microglial, que leva a síntese de fator de crescimento derivado do encéfalo (BDNF), quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias que indiretamente aumentam a excitabilidade pós-sináptica e inibem o transporte de glutamato para fora da fenda sináptica entre os neurônios de primeira e segunda ordem formando um ciclo vicioso (GANGADHARAN; KUNER, 2013).

Normalmente no corno posterior da medula espinal ocorre a estimulação de interneurônios que secretam neurotransmissores com repercussões inibitórias, como GABA, glicina e encefalinas, mantendo o controle inibitório da nocicepção (Figura 2). Os controles mais rápidos são exercidos pelos sistemas gabaérgicos e glicinérgicos, os quais

também são a base da teoria da comporta da dor. A perda da funcionalidade do sistema gabaérgico pode ocorrer após a troca no gradiente intracelular de cloreto (Cl^-) causada pela redução na expressão de canais cotransportadores de K^+ e Cl^- (KCC2) decorrente de lesão nervosa periférica ou mesmo reatividade microglial e produção de BDNF na sensibilização central (SANDKÜHLER, 2009; BASBAUM et al., 2009; GANGADHARAN; KUNER, 2013).

Figura 2 - Sistemas descendentes de inibição da dor.



Legenda: Em vermelho observa-se a via neoespinotalâmica. Em verde observa-se a via denominada paleoespinotalâmica com suas projeções ao mesencéfalo e também ao hipotálamo. Estas sinapses nestes sítios são determinantes para a modulação da dor, especialmente no controle inibitório, que é mediada pela Substância Cinzenta Periaquedutal, Núcleo Magno da Rafe, *locus ceruleus* e Núcleo Reticular Gigantocelular. Suas fibras são descendentes (azul) e fazem sinapses nas lâminas superficiais do corno posterior da medula espinhal.

Fonte: Adaptado de Steeds (2013).

Em relação à modulação da dor, o sistema monoaminérgico descendente também contribui e pode facilitar ou inibir as aferências nociceptivas no corno posterior da medula espinal. Dois grupos de neurônios se destacam nesta função, neurônios noradrenérgicos do *locus ceruleus* e do núcleo reticular gigantocelular (NRGC), e neurônios serotoninérgicos da região ventro rostral do bulbo que inclui o núcleo magno da rafe (NMR). Há a existência de alças que alimentam estes neurônios, como a exercida pela SCPA, onde seus neurônios projetam-se tanto para o *locus ceruleus* quanto para o NMR. Acredita-se que a inibição ocorra pelas projeções descendentes destes núcleos às laminas superficiais do corno posterior da medula espinal, aumento da excitabilidade de interneurônios inibitórios e/ou por uma neurotransmissão direta com neurônios da via da dor (GEBHART, 2004; STEEDS, 2013; KANDEL et al., 2013). A figura 2 demonstra as vias do sistema de inibição descendente da dor.

2.1.1 Dor neuropática periférica e degeneração walleriana

A dor neuropática periférica resulta de lesões ou doenças que acometem o Sistema Nervoso Periférico (SNP), sendo comuns e difíceis de tratar. Pacientes podem sentir dor espontânea, ou seja, na ausência de um estímulo nociceptivo óbvio sob a forma de agulhada, queimação e até mesmo dormência (ZOCHODNE, 2008; MOFFAT; RAE, 2010; STEEDS, 2013).

Doenças como câncer, o vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV), lesões traumáticas por acidentes e mesmo procedimentos cirúrgicos podem induzir a dor neuropática (OMS, 2007; OMS, 2012). Comumente, o quadro de dor pode perdurar por um período superior a seis meses. Nestes casos, a dor persiste após a recuperação da lesão tecidual tornando-se crônica que é muito diferente da dor aguda, pois não possui um propósito útil e apenas faz sofrer os pacientes (LOESER; TREEDE, 2008; BASBAUM et al., 2009; KANDEL et al., 2013).

Neste contexto, a gravidade de casos de dor crônica pode ser observada na revisão sistemática realizada por Lynch e colaboradores (2008), em que pacientes com dor demonstram uma piora ou têm deterioração de seus quadros dolorosos. Isto se reflete em um comprometimento da qualidade de vida e do bem estar psicológico devido ao um longo período de espera (aproximadamente seis meses) para atendimento após o encaminhamento a centros de tratamento da dor

(fisioterapia e abordagens multiprofissionais). Estas observações demonstram uma falha no atendimento à demanda que ao mesmo tempo está relacionada à escassez de pessoal qualificado disponível, assim necessita-se de novas abordagens e que estes pacientes sejam encaminhados para atendimento o mais precoce possível.

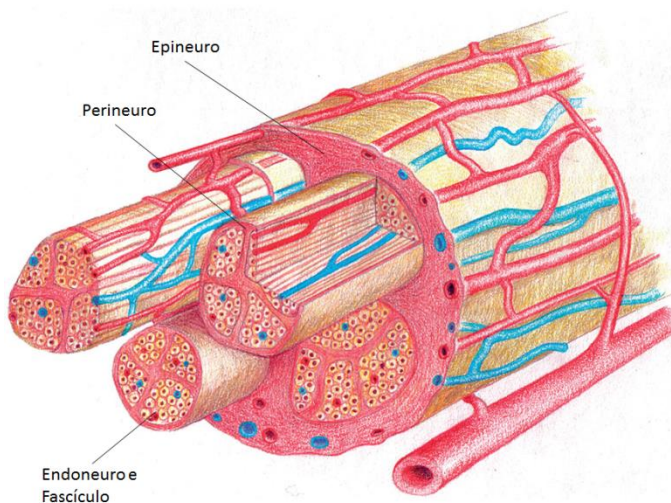
A prevalência de dor neuropática demonstra que parece ser um grande problema de saúde pública. Em países desenvolvidos da América do Norte e Europa onde os estudos epidemiológicos são realizados com maior frequência e possuem registros, pelo menos, desde 1999. Há a prevalência de dor crônica com características ou de origem neuropática variando de 3,3 a 17,9% em grandes amostras (de 1.207 a 23.712 pessoas) (VOSCOPOULOS; LEMA, 2010; SMITH; TORRANCE, 2012).

Embora já existam muitos fármacos disponíveis e outros com potencial efeito positivo no tratamento da dor neuropática há possibilidade de insucesso no tratamento pelos pacientes tornarem-se muitas vezes refratários a esta abordagem e ainda os efeitos colaterais dos próprios fármacos que variam de reação alérgica à sedação, tonturas, ataxia e tremores. Tornando-se um desafio escolher a terapia correta (SINISCALCO; ROSSI; MAIONE, 2007; JENSEN; MADSEN; FINNERUP, 2012).

Após uma lesão nervosa periférica ocorrem importantes eventos neurobiológicos que contribuem para a sensibilização central e podem evoluir para o estado de dor crônica. Tais como o recrutamento de células imunes ao local da lesão, que é uma típica resposta inflamatória logo após a lesão e leva a reatividade microglial no gânglio sensorial do nervo espinal e no corno posterior da medula espinal. Aumento na expressão de canais de Na^+ voltagem dependente no neurônio aferente primário, que podem passar a abrir de forma ectópica e aumentar a excitabilidade destes neurônios, assim passam a ter atividade ectópica. Todos estes estímulos promovem sintomas e fenômenos como alodinia, hiperalgesia, dor espontânea e sensibilização central presentes em quadros de dor neuropática e/ou crônica (SCHOLZ; WOOLF, 2007; SINISCALCO; ROSSI; MAIONE, 2007; COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009).

As lesões aos nervos podem ser classificadas de acordo com o tipo de lesão e o grau de acometimento do tecido nervoso. De acordo com Seddon (1943) e Sunderland (1951) os quais classificaram as lesões nervosas em duas formas distintas. Ver figura 3 para a anatomia do nervo e figura 4 para as classificações das lesões no SNP.

Figura 3 - Anatomia dos nervos periféricos.



Legenda: O epineuro é a camada mais externa contendo camadas de tecido colagenoso, vasos sanguíneos e linfáticos, e células residentes como macrófagos, mastócitos e fibroblastos. O perineuro é encontrado mais profundamente ao epineuro circundando e protegendo os fascículos endoneurais. Este também constitui parte da barreira sangue nervo. E por fim o endoneuro que contém grupamentos axonais, células de Schwann e células imunes residentes. Também organiza os axônios em compartimentos endoneurais conhecidos como fascículos.

Fonte: Adaptado de Zochodne (2008).

2.1.1.1 Degeneração Walleriana

As lesões nervosas periféricas, dependendo do grau, podem causar o processo de degeneração Walleriana e regeneração axonal na porção distal à lesão. De modo geral há o envolvimento de células não neurais na perda da mielina das células de Schwann, fagocitose dos debris do citoesqueleto neuronal, produção de citocinas próinflamatórias e ativação de macrófagos residentes, liberação de neurotrofinas, e assim o crescimento do axônio e reconexão do nervo com seus alvos periféricos (GAUDET; POPOVICH; RAMER, 2011). Os principais eventos de degeneração e regeneração são observados na figura 5.

Figura 4 - Classificação das lesões nervosas periféricas.

Comparação das classificações das lesões do sistema nervoso periférico.				
Seddon (1975)	Sunderland	Perda Funcional	Lesão Anatômica	Neurofisiologia
Neuropraxia (não degenerativa)	Grau I	Força muscular, gnose.	Bainha do axônio e fibra nervosa intacta	Mantém condução distal, sem fibrilação
Axoniotmese (degenerativa)	Grau II, III	Todas modalidades	Interrupção do axônio e degeneração Walleriana distal	Perda da condução; fibrilação
Neurotmese (degenerativa)	Grau IV, V	Todas modalidades	Interrupção do tronco nervoso; degeneração Walleriana	Perda da condução; fibrilação

Legenda: Na neuropraxia (grau I) ocorre pequena desmielinização em alguns segmentos internodais dos axônios causando uma paralisia focal temporária. Já na axoniotmese (grau II e III) há comprometimento axonal distal à lesão, levando a sua degeneração bem como da bainha de mielina de células de Schwann (degeneração Walleriana). Esta lesão em seu grau mais avançado pode levar a ruptura do endoneuro (tecido conectivo). Na neurotmese (grau IV e V) ocorre uma lesão que afeta tecido nervoso e conectivo onde pode chegar à separação total da porção proximal e distal à lesão.

Fonte: Zochodne (2008) e Martins (2008).

Entretanto o processo de degeneração e regeneração é complexo e envolvem fatores neuronais, imunes, crescimento, sobrevivência e de reinervação do órgão alvo.

Do sítio da lesão para a direção distal ocorre primeiramente a fragmentação axonal. Um processo degenerativo intrínseco e independente de outras células que parece estar relacionado ao aumento de Ca^{2+} intracelular e ativação de calpains que leva a degradação de componentes de citoesqueleto, como os microtúbulos e os neurofilamentos. Ativação do sistema ubiquitina-proteassoma também está relacionada a este evento, que culmina na degeneração do axônio em apenas detritos celulares (GAUDET; POPOVICH; RAMER, 2011; DUBOVÝ, 2011).

Concomitante e posterior à degradação axonal há a mudança de fenótipo do neurônio e das células de Schwann distais. O neurônio deixa seu “modo” predominantemente transmissor e produtor de neurotransmissores, e prioriza a promoção de crescimento e

sobrevivência (estado pró-regenerativo). No corpo neuronal ocorre cromatólise, onde os ribossomos dissociam-se do retículo endoplasmático rugoso ficando livres no citoplasma, edema, retração dendrítica e posicionamento excêntrico do núcleo celular (FU; GORDON, 1997; NAVARRO; VIVÓ; VALERO-CABRÉ, 2007).

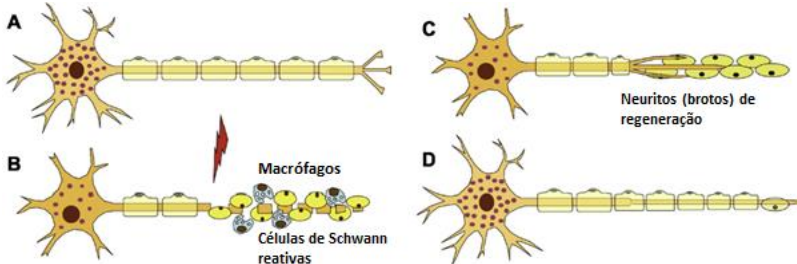
O próprio neurônio bem como células de Schwann e macrófagos residentes liberam citocinas e quimiocinas como IL-1, TNF- α , proteína quimioatrativa de macrófagos-1 (MCP-1), que atraem mais células imunes (como células T, neutrófilos, monócitos e macrófagos hematogênicos) para a lesão e assim auxiliam indiretamente na perda de mielina pelas células de Schwann e também na fagocitose dos detritos celulares. Apesar de ser um estímulo pró-inflamatório e induzirem a neuropatia, contribuem para a expressão de NGF nas células de Schwann diferenciadas (CÁMARA-LEMARROY; GUZMÁN-DE LA GARZA; FERNÁNDEZ-GARZA, 2010; GAUDET; POPOVICH; RAMER, 2011; DUBOVÝ, 2011; ALLODI; UDINA; NAVARRO, 2012).

As células de Schwann mudam seu fenótipo para não-mielinizante, perdem sua mielina (diferenciação) e se proliferam na lamina basal (MEC). Esta perda de mielina também permite o início da regeneração nervosa pela degradação de fatores inibitórios como a glicoproteína associada à mielina. Ao mesmo tempo aumenta a expressão de genes associados à regeneração que dão origem a proteína associada ao crescimento (GAP-43) e fatores neurotróficos como o fator de crescimento derivado da glia (GDNF), NGF, BDNF, IGF-1 e a neurotrofina-3. A perda do contato entre as células de Schwann e o axônio (já degradado) induz estas células a expressarem substratos para o cone de crescimento do novo axônio. Então além dos fatores de crescimento que auxiliam no direcionamento, fibronectina, laminina, tenascina, e proteoglicanos servem de substrato durante o alongamento do novo axônio em direção ao órgão alvo (FU; GORDON, 1997; NAVARRO; VIVÓ; VALERO-CABRÉ, 2007; ALLODI; UDINA; NAVARRO, 2012; ARMADA-DA-SILVA et al., 2013).

A síntese de fatores de crescimento como o NGF durante a regeneração também permite que este seja transportado retrogradamente até o soma e ative a transcrição de mais fatores de crescimento como o BDNF e o próprio NGF. Curiosamente este mecanismo contribui para a sensibilização central e hiperalgesia durante o processo regenerativo (SCHOLZ; WOOLF, 2007; KANDEL et al. 2013).

No trajeto o qual irá haver o crescimento e reinervação há, além de um ambiente trófico rico, uma modulação do crescimento e direcionamento do axônio pela presença de fatores atrativos e repulsivos que ocorre também pelos níveis locais de nucleotídeos cíclicos (monofosfato de adenosina/guanosina-cíclica), citocinas anti- e pró-inflamatórias. As citocinas anti-inflamatórias como a IL-4 também promovem efeitos na sobrevivência neuronal, proteção por regular macrófagos e reduzir os níveis de TNF- α , e crescimento do cone por estimular a síntese de neurotrofinas de maneira dose dependente (VIDAL et al., 2013).

Figura 5 - Degeneração e regeneração nervosa periférica após um evento lesivo.



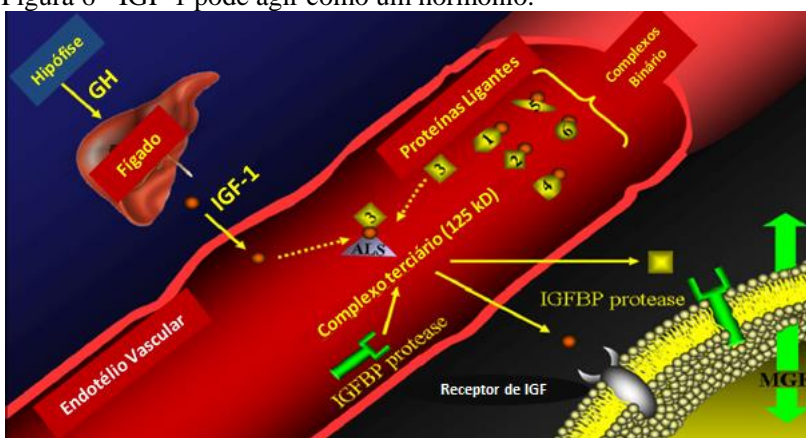
Legenda: Em (A) observa-se um neurônio normal. Após lesão (B) ocorre a Degeneração Walleriana onde há fragmentação axonal distal a lesão, perda da bainha de mielina em células de Schwann que se proliferam e tornam-se reativas, promovendo suporte trófico, e ainda infiltração de macrófagos que realizam a fagocitose de detritos celulares. (C) O alinhamento das células de Schwann forma a faixa de Bünger a qual o broto axonal será atraído pelos fatores de crescimento que o guiará a seu órgão alvo (D). Concomitantemente há a remielinização das células de Schwann. Axônio e mielinas não retornam a mesma espessura de antes da lesão. Fonte: Adaptado de Allodi, Udina e Navarro (2012).

2.2 FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA (IGF-1)

O IGF-1 do inglês *insulin-like growth factor-1*, é um peptídeo estruturalmente homólogo à insulina, entretanto possui dois domínios proteicos adicionais e é sintetizado em diversos tecidos (fígado, músculos, ossos e tecido nervoso) assim como o outro membro de sua família, o IGF-2 (DUAN; REN; GAO, 2010; NINDL; PIERCE, 2010).

No fígado ocorre grande produção durante o período de desenvolvimento embrionário e pós natal, pois o hormônio do crescimento (GH) é liberado maciçamente pela adenohipófise e atua nas células hepáticas que sintetizam e liberam IGF-1 (Figura 6). Assim, o IGF-1 participa da maturação e crescimento de muitos tecidos como o nervoso, ósseo, muscular e reprodutivo (GOLDSPINK; YANG, 2001; DAI, 2010; NINDL; PIERCE, 2010). Apesar do fígado ser a fonte primária, o encéfalo, os ossos e músculos esqueléticos também são responsáveis por sua síntese local (PHILIPPOU; BARTON, 2014).

Figura 6 - IGF-1 pode agir como um hormônio.



Legenda: Após sinalização hepática por hormônio do crescimento (GH), ocorre a síntese e liberação de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1). Este pode se associar a suas proteínas carreadoras ou ligantes (IGFBP) 1 à 6, formando complexos ternários (~75%), binários (~20-25%) ou estar em sua forma livre (~2%). Estas proteínas ligantes regulam diretamente a ação do IGF-1, onde a IGFBP-1 e 4 parecem inibir a atividade proteica no músculo esquelético. Estas proteínas ligantes também medeiam qual sítio o IGF-1 permanecerá após a síntese. O que pode ser temporário, pois a IGFBP protease pode dissociar esta ligação. Apenas formas livres e binárias são capazes de deixar a corrente sanguínea.

Fonte: Adaptado de Nindl e Pierce (2010).

Nos músculos sua expressão é elevada durante o desenvolvimento das junções neuromusculares e direciona os axônios de neurônios motores ao órgão alvo. Apesar de acontecer reduções em sua expressão após este evento, o IGF-1 continua exercendo efeito na manutenção das junções neuromusculares em longo prazo. Entretanto a

perca de placas motoras nestas junções decorrentes do envelhecimento ou mesmo doenças neuromusculares como a esclerose lateral amiotrófica é proporcional à redução da expressão de IGF-1 (NINDL; PIERCE, 2010; SONG et al., 2013).

Além de atuar durante o desenvolvimento, em períodos posteriores o IGF-1 é necessário para manutenção tecidual global. Apesar da grande diminuição em idades avançadas que atinge também a secreção de GH, o exercício físico pode ser uma boa alternativa para reduzir este declínio (GOLDSPINK; YANG, 2001).

A tradução do seu gene está sujeita a regulação por fatores como hormônios, nutrição, fatores locais e estresse mecânico. Dentro de suas isoformas, podemos destacar a forma induzida por tensão muscular IGF-1Ec (humanos) e IGF-1Eb (roedores) ou fator de crescimento mecânico (MGF) sintetizado no próprio tecido. De fato em estudos realizados com humanos foi demonstrado que em músculos esqueléticos de membro inferior ou superior que recebem sobrecarga excêntrica, há maior concentração de RNA mensageiro (RNAm) de IGF-1 e provavelmente na isoforma induzida mecanicamente (BAMMAN, 2001; HAMEED, 2008; DAI, 2010).

O IGF-1 age sobre receptores do tipo tirosina-cinase que estimulam cascatas intracelulares relacionadas a crescimento celular, diferenciação e sobrevivência por inibir atividade de caspases que estão intimamente envolvidas no processo de apoptose. Estes receptores amplamente distribuídos estão em diversos tecidos e parecem estar envolvidos no processo de regeneração muscular, hipertrofia muscular e no processo de regeneração nervosa e remielinização atuando de forma autócrina e/ou parácrina (HANSSON, 1986; DUAN; REN; GAO, 2010; DAI, 2010; NINDL; PIERCE, 2010).

A sua expressão é sensível ao exercício físico e lesões ao tecido muscular. Em humanos, há expressão aumentada já aproximadamente duas horas após estresse mecânico induzido por EE. Coincidindo com ativação de células satélites que reparam o tecido. Estas células miogênicas ativas tornam-se mioblastos e substituem as fibras lesionadas via diferenciação e fusão, mediante a expressão ou exposição a fatores de crescimento (DAI, 2010; SONG, 2013).

Após desnervação muscular, há perda no volume muscular e seletiva hipotrofia de fibras musculares tipo II e este processo é denominado sarcopenia. Esta sarcopenia também está presente em casos de esclerose lateral amiotrófica, trauma, poliomielite viral e em neuropatias periféricas. Os mecanismos que explicam a hipotrofia inclui inflamação, estresse oxidativo, níveis aumentados de *Gadd45a* (uma

proteína nuclear pequena induzida por desnervação e jejum, que estimula proteólise, reduz síntese proteica e inibe o anabolismo), miostatina e até mesmo redução da atuação de sinalização por Notch sobre células satélites (progenitoras) (GOLDSPINK; WESSNER; BACHL, 2008; EBERT, 2012; BONGERS, 2013; SONG, 2013; PHILIPPOU; BARTON, 2014).

Segundo um interessante estudo realizado por Day e colaboradores (2002), o IGF-1 administrado em gastrocnêmios apenas durante uma semana, promoveu manutenção de diâmetro de fibras musculares, peso muscular e força pelo menos até a quarta semana após desnervação crônica induzida pela retirada de um segmento do nervo isquiático de camundongos adultos.

Embora ainda não haja consenso para a utilização clínica do IGF-1 no tratamento de doenças levam ao declínio de massa magra e assim preservar e prevenir maiores perdas de musculatura. Estudos pré-clínicos têm indicado o importante potencial terapêutico do IGF-1 no reparo e regeneração do tecido muscular, os quais demandam a mobilização de células satélites. De fato, salienta-se não só a necessidade da ativação destas células progenitoras, mas também de um mecanismo para aumentar a expressão de IGF-1 para que este, por sua vez, ative o ciclo celular em células satélites que irão deixar de ser quiescente, e conseqüentemente promova a ativação da via miogênica e fusão com as fibras musculares auxiliando no reparo e/ou adaptação muscular. Desta forma, o exercício físico pode atuar de forma direta, pois, pode atuar ativamente nos componentes desta via de regeneração (BAMMAN, 2001; HAMEED, 2008; GOLDSPINK; WESSNER; BACHL, 2008; DAI, 2010; SONG, 2013; MCMAHON, 2013).

Outro aspecto considerável, é que a movimentação dos membros posteriores de animais submetidos à lesão de medula espinal aumenta a expressão de fatores de crescimento, dentre os quais está o IGF-1. Como sua atividade se dá também pela via da fosfatidil inositol-3-Cinase/Proteína Cinase B (PI3K/Akt ou PKB), o IGF-1 pode manter o balanço entre fatores pro- e anti-apoptóticos e diminuir a apoptose, pela inativação da forma ativa da caspase-3 e assim contribuir para a sobrevivência neuronal (JUNG, 2014).

O IGF-1 também pode atuar modulando positivamente a dor em nível medular. De fato, foi demonstrado que a administração intratecal de IGF-1 aumentou o limiar sensorial nociceptivo tanto em animais submetidos a um modelo de diabetes tipo I quanto nos animais controle,

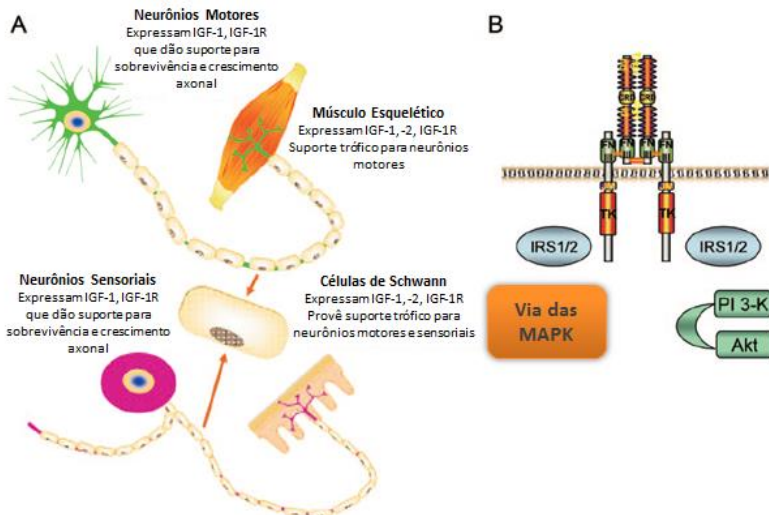
onde seu o efeito perdurou por mais de uma hora (BITAR, 1996; BITAR; PILCHER, 1998).

Zhuang e colaboradores (1996) demonstraram que administrações subcutâneas de IGFs conseguem impedir a progressão dos sintomas de hiperalgesia associado a lesão do nervo isquiático. Fato interessante, pois, recentemente foi demonstrado que a administração intraplantar de IGF-1 está relacionada a nocicepção aguda, ou seja, é capaz de excitar neurônios aferentes primários nociceptivos via abertura de canais de Ca^{2+} tipo T, expressos nos gânglios sensoriais do nervo espinal os quais tem sido relacionado a hiperalgesia (ZHANG, 2014; STEMKOWSKI; ZAMPONI, 2014).

2.2.1 IGF-1 e Regeneração nervosa periférica

No sistema nervoso o IGF-1 têm demonstrado apresentar importante efeito neuroprotetor e regenerativo, sendo capaz de promover a proliferação e diferenciação de oligodendrócitos, células de Schwann e crescimento axonal em modelos animais e de cultura de células atuando sinergicamente com outros fatores neurotróficos como o fator de crescimento neural (NGF) (GOLDSPINK, 1999; GOLDSPINK; YANG, 2001; JONES, 2003; RABINOVSKY; DEBAKEY, 2004; PHILIPPOU, 2007; WALT, 2010).

Figura 7 - Locais de expressão e ações periféricas dos IGFs no sistema sensorial e motor.



Legenda: A expressão de IGF-1, -II e IGF-1R ocorre em células neurais (neurônio sensorial e motor) e não-neurais como as células de Schwann e musculares. Os efeitos biológicos após ativação de receptores IGF-1R são críticos para a sobrevivência, proliferação e diferenciação destas células (A). Quando ativado o receptor IGF-1R (B) sofre auto-fosforilação em resíduos de serina em suas subunidades β . Assim, há a ligação de substratos do receptor de insulina (IRS) 1/2 nestas subunidades que ativam principalmente duas vias, das MAPK (destacando o crescimento neuronal como um dos efeitos) e da PI3K/Akt (papel importante na sobrevivência neuronal). Fonte: Adaptado de Sullivan, Kim e Feldman (2008).

Além de ser uma neurotrofina necessária durante o desenvolvimento do sistema nervoso a expressão de IGF-1 parece ser fundamental no processo regenerativo após lesões nervosas periféricas. Onde duas horas após o evento lesivo já há sua expressão nos nervos mediada pelas células de Schwann, sendo que sua expressão é proporcionalmente aumentada em relação ao dano tecidual. Assim, os IGFs parecem dar suporte à regeneração nervosa, que quando concluída, coincide com reduções nos níveis deste fator de crescimento (GLAZNER; MORRISON; ISHII, 1994; SULLIVAN; KIM; FELDMAN, 2008).

Em um estudo realizado por Pu e colaboradores (1995), foi demonstrado que o esmagamento do nervo isquiático promove aumento das concentrações do IGF-1. As maiores expressões do seu RNAm foram detectadas no 4º e 6º dia no sítio do esmagamento e só foi

normalizada no 10º dia, tal fato coincidiu com o restabelecimento dos componentes do citoesqueleto. Assim, pôde-se observar que a expressão do RNAm do IGF-1 parece progredir em direção distal, onde ocorre o processo de degeneração/regeneração, e retornou aos níveis basais (pré-lesão) quando não haviam mais sinais de lesão e de crescimento axonal.

Estas evidências demonstram um efeito importante do IGF-1 sobre a regeneração e prolongamento de axônios, em parte, por atuar na formação das faixas de Bünger, constituídas pela proliferação e alinhamento das células de Schwann em sua lâmina basal após axoniotmese. Assim, o IGF-1 auxilia na regeneração nervosa por auxiliar na ativação e manutenção do suporte trófico proveniente das células de Schwann ao axônio que está se regenerando (PU, 1995; GAUDET; POPOVICH; RAMER, 2011).

O receptor do IGF-1, o IGF-1R, é expresso no sistema nervoso, em especial nas células de Schwann ou mesmo em neurônios, e como mencionado anteriormente são ativados durante a regeneração nervosa. Além disto, o microambiente regenerativo é a principal fonte de IGF-1; neste caso, a produção local de IGF-1 é mais importante do que a proveniente da circulação (liberado de forma sistêmica). Entretanto, o GH indutor deste peptídeo, pode aumentar a taxa de regeneração nervosa possivelmente por ação direta ou mesmo por estimular a produção de neurotrofinas locais. E ainda após uma axoniotmese, por exemplo, há o comprometimento temporário da barreira sangue-nervo, o que favorece a passagem de moléculas tróficas ao sítio de regeneração (KANJE; SKOTTNER; LUNDBORG, 1988; SULLIVAN; KIM; FELDMAN, 2008; ZOCHODNE, 2008).

2.3 EXERCÍCIO FÍSICO

De forma geral, a realização de atividade física é um comportamento básico na promoção de saúde. Uma estimativa de 2007 mostra que mais de 5 milhões de mortes por doenças não-comunicáveis poderiam ter sido evitadas se estes indivíduos realizassem tempo suficiente de atividade física (KOHL et al. 2012).

Evidências de pesquisas de cunho pré-clínico e clínico demonstram que o exercício físico, seja treinamento de força ou contínuo e aeróbio, tem apresentado resultados positivos em relação à redução da dor e da mortalidade, onde ele é um fator importante na redução dos riscos e no aparecimento de doenças não-comunicáveis crônicas, como as cardiovasculares e o câncer (BLAIR et al., 1989;

MANNICHE et al., 1991; KOLTYN; SOUZA, 2009; OMS, 2013; BOBINSKI et al., 2011).

Os benefícios da prática regular de exercício físico na melhora da função arterial ocorrem devidos às modificações hemodinâmicas (em especial pelo remodelamento e alterações endoteliais), sendo estas ações oriundas dos mecanismos de adaptação promovidos pelo exercício físico. Além disto, a sensibilidade à insulina, diminuição de adiposidade corporal e do risco de câncer também são adaptações positivas. Estima-se que praticantes de exercício físico regulares têm uma redução da incidência de risco de morte geral em 30% (BOOTH; ROBERTS; LAYE, 2012).

O exercício físico parece também exercer efeitos indiretos no sistema nervoso, pois, metabólitos como o lactato parecem influenciar na plasticidade neuronal e potenciação de longo prazo de células nervosas. Estes efeitos são decorrentes da ativação e modulação de receptores NMDA, das cinases da família de MAPK e por induzir a expressão de genes imediatamente precoces essenciais para sustentar os fenômenos de plasticidade neuronal (YANG et al., 2014).

Evidências demonstram que exercícios físicos realizados de forma regular, podem ser uma ferramenta não-farmacológica para melhorar as condições clínicas na doença de Alzheimer e no envelhecimento. Estes efeitos parecem ser dependentes da liberação de fatores de crescimento que é promovido pela prática do exercício físico. Dentre os diversos fatores de crescimento sintetizados localmente ou que cruzam a barreira hematoencefálica estão o BDNF, GH e IGF-1 (LLORES-MARTÍN; TORRES-ALEMÁN; TREJO, 2008; HEEMST, 2010; LECKIE et al. 2014; CHO et al., 2015).

Os estudos experimentais em animais, denominados de pré-clínicos, têm auxiliado no entendimento e elucidação de hipóteses sobre como possivelmente o exercício físico poderia influenciar na neurogênese e em tarefas cognitivas. Assim, a principal hipótese aceita é que a ação do exercício físico parece ser mediada por neurotrofinas liberadas no sistema nervoso central e/ou periférico (LLORES-MARTÍN; TORRES-ALEMÁN; TREJO, 2008; LLORES-MARTÍN; TORRES-ALEMÁN; TREJO, 2010).

2.3.1 Exercício físico na redução da dor

A dor quando crônica, presente comumente em quadros de fibromialgia, osteoartrite e nas lombalgias, é um problema de saúde pública e um fardo para os familiares dos pacientes acometidos. Como o tratamento envolve muitos fatores, o exercício físico tem sido indicado como um adjuvante (KOLTYN, 2002; KANDEL et al., 2013; DAENEN et al., 2015).

O efeito do exercício físico na modulação da dor é complexo, porém os mecanismos pelos quais ocorre a inibição da dor são conhecidos apenas em parte e possíveis integrações de circuitos neuronais e de neurotransmissores estimuladas pelo exercício físico estão sendo recentemente descritas (NAUGLE; FILLINGIM; RILEY, 2012).

De fato, foi demonstrado que a adenosina, um produto do metabolismo do trifosfato de adenosina pertencente ao sistema purinérgico, a qual ativa receptores do tipo A_1 (SAWYNOK, 1998; MARTINS et al., 2013); opioides endógenos (como endorfinas) (DISHMANN; O'CONNOR et al., 2009); noradrenalina presente em neurônios do *locus ceruleus* (SZABADI, 2012; PERTOVAARA, 2013); serotonina, principalmente de neurônios da SCPA e do NMR (GEBHART, 2004; MOFFAT; RAE, 2010; MAZZARDO-MARTINS et al., 2010) e; endocanabinóides, onde destaca-se a anandamida (AEA) que ativa receptores do tipo CB_1 (RAICHLEN et al., 2013) estão envolvidos no efeito analgésico do exercício físico.

Intensidades moderadas e altas em que se realizam os exercícios físicos parecem ser determinantes para o seu importante efeito analgésico. Além disto, correlações positivas têm sido feitas entre maiores intensidades de treino e hipotalgesia após exercício. Contudo, foi também verificado que nem todos os indivíduos apresentavam analgesia quando a intensidade foi escolhida pelo indivíduo enquanto realizava o exercício (KOLTYN, 2002). Assim a forma de execução do exercício parece promover efeitos de magnitude diferenciada. Exercícios resistidos e intervalados parecem induzir hipotalgesia apenas por poucos minutos, enquanto o exercício contínuo (aeróbio) pode induzir por até 30 minutos após o término do exercício (KOLTYN, 2002; DAENEN et al., 2015).

O eixo GH-IGF-1 é uma via estudada, pois, o IGF-1 atua em cascatas de ativação enzimáticas que inibem a enzima glicogênio sintase cinase- 3β (GSK- 3β), que por sua vez tem sido associada a sensibilização central e dor crônica (PARKITNA, 2006; HEEMST, 2010; EMAMIAN, 2012; MAZZARDO-MARTINS et al., 2012). Após o exercício outra característica é o aumento nos níveis de endocanabinóides como o 2-

araquidonoilglicerol (2-AG) e a AEA. Estes ácidos graxos são ligantes naturais de receptores CB₁ e estão mais presentes na circulação, onde a sua liberação parece ser dependente da intensidade. De fato, foi demonstrado que quando se atinge ~70% da frequência cardíaca máxima ocorre, ou seja, se obtém o ponto mais sensível para o aumento na produção e liberações de 2-AG e AEA (RAICHLEN et al., 2013; KOLTYN et al. 2014).

Outros mediadores importantes envolvidos no efeito analgésico do exercício físico são os opioides endógenos e a serotonina. Ambos são sintetizados no SNC e podem agir na modulação descendente da dor (medula espinal). Esta modulação é um mecanismo chave no controle da dor, afinal, em síndromes como a fibromialgia em que a dor crônica é uma característica, ocorre uma falha na ativação de vias descendentes inibitórias mediadas também por estes transmissores (GOLDFARB et al., 1990; MAZZARDO-MARTINS et al., 2010; NIJS et al., 2012; KANDEL et al., 2013; DAENEN et al., 2015).

2.3.2 Exercício físico e regeneração nervosa periférica

Em estudos com modelos animais de dor neuropática, que é causada ou iniciada por uma lesão no tecido nervoso, foi demonstrado que ocorre alteração do limiar sensorial e que respostas como alodinia e hiperalgesia estão presentes (STEEDS, 2013). Ademais o exercício físico aeróbio realizado em esteira rolante foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica e térmica, bem como promoveu regeneração das fibras nervosas lesadas. Este último é provável que seja mediado por fatores de crescimento nervosos os quais tem sua expressão aumentada pelas sessões de exercício (BOBINSKI et al., 2011; ENGLISH; WILHELM; SABATIER, 2011).

Estudos pré-clínicos têm dado suporte a ideia de que a regeneração nervosa pode ser acelerada quando os animais passam por algum protocolo que exija movimentos passivos ou atividade locomotora forçada (MARTINS et al., 2011; COBIANCHI et al., 2013). No entanto, o grau de lesão, como axoniotmese e neurotmese, e ainda o volume e intensidade ideal para que o exercício potencialize a regeneração nervosa necessitam de esclarecimento (COBIANCHI et al., 2010; BOBINSKI et al., 2011; ENGLISH; WILHELM; SABATIER, 2011; ARMADA-DA-SILVA et al., 2013).

Cabe ressaltar que o aumento na expressão de fatores neurotróficos induzida pela atividade física nestes modelos

experimentais é inegável (ARMADA-DA-SILVA et al., 2013). Sabatier e colaboradores (2008) demonstraram num modelo de transecção do nervo e reparo que o protocolo de exercício aeróbio forçado em esteira aumentou o brotamento e alongamento do coto distal quando comparado a animais *crush* e não-exercitados. O que pode ser explicado pelo aumento nos níveis de GDNF, BDNF e IGF-1 no nervo e músculo induzidos pelo protocolo de exercício em esteira (PARK; HÖKE, 2014). O aumento na concentração de GDNF, BDNF e neutrofina-3 são detectados após a realização de exercício em animais sem lesões em estruturas do sistema nervoso. O que demonstra um efeito *per se* do exercício na expressão medular destas neurotrofinas, essenciais na sobrevivência neuronal (GÓMEZ-PINILLA et al. 2001; WILHELM et al., 2012; ARMADA-DA-SILVA et al., 2013).

Os efeitos de cada neurotrofina são dependentes do tipo de receptor que cada uma ativará. Após a ativação destes seus efeitos biológicos ocorrerão. Após essa ativação é provável que haja atividade de adenilato ciclases, aumento de monofosfato-cíclico de adenosina (AMPC) e assim a PKA levando a expressão de genes relacionados ao crescimento axonal mediado pelo elemento de resposta ao AMPC (CREB) (GORDON, 2009; KANDEL et al., 2013).

A via das cinases reguladas por sinais extracelulares (ERK, da família das MAPK) também parece estar relacionada à regeneração nervosa, pois, há aumento na fosforilação destas enzimas principalmente após o exercício físico, sugerindo um efeito positivo na aceleração do crescimento do nervo. Como mencionado anteriormente o IGF-1, é um fator de crescimento, que é liberado pelo exercício que atua na regeneração nervosa periférica. Este ativa um receptor do tipo tirosinacina-se que por sua vez ativa as cascatas das ERK e/ou da Akt/PKB (SULLIVAN; KIM; FELDMAN, 2008; KANDEL et al., 2013; ARMADA-DA-SILVA et al., 2013). Ver figura 8.

Outro mecanismo que pode aumentar a regeneração é o aumento dos níveis circulantes de BDNF e IL-6. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória liberada por células de Schwann e macrófagos após a degeneração axonal e fornece suporte trófico promovendo o crescimento do neurito (axônio). O exercício também pode potencializar a regeneração nervosa pelo aumento das concentrações destas citocinas e de BDNF, que são miocinas sintetizadas no músculo esquelético e que marcadamente há aumento sérico após sessões de exercício (MURPHY et al., 1995; GAUDET; POPOVICH; RAMER, 2011; PEDERSEN, 2013).

2.3.3 Exercício Excêntrico

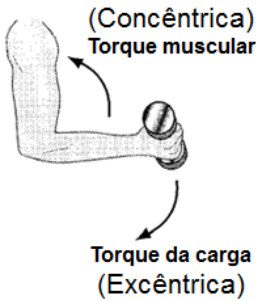
É importante salientar que nos movimentos realizados diariamente em atividades comuns, como nos de abaixar para colocar os sapatos ou mesmo durante diferentes esportes, podem ocorrer contrações musculares isométricas, concêntricas e excêntricas (ISNER-HOROBETI, 2013).

As contrações musculares concêntricas e isométricas são realizadas quando nos locomovemos ou mesmo quando apertamos a mão de alguém ou algum objeto. Nesta situação, realizamos a contração e não há movimento, ou seja, certo músculo contrai, mas não movimenta o seguimento o qual está inserido. Isto se caracteriza por uma contração isométrica, onde o torque exercido pelo músculo e o torque exercido pela resistência (segmento corporal, por exemplo) são equivalentes. Caso o torque exercido pela musculatura seja maior, haverá a contração concêntrica e assim haverá uma movimentação ou ação motora específica (como a fase de subida durante um agachamento) (ENOKA, 1996; ISNER-HOROBETI, 2013).

Já durante as ações musculares excêntricas o trabalho muscular exerce uma ação de frenagem, pois o torque da resistência (segmento corporal, por exemplo) é maior que o do músculo agonista. Assim, este músculo ativado é alongado e ao mesmo tempo realiza contração, caracterizando a contração excêntrica (ENOKA, 1996; ISNER-HOROBETI, 2013). A figura 8 ilustra a explicação do texto.

Apesar de registros de eletromiografia demonstrarem que numa contração concêntrica máxima há maior atividade e recrutamento de unidades motoras do que em contrações excêntricas máximas, há um comportamento diferenciado das miofibrilas nas células musculares. Tomando por base a teoria das pontes cruzadas, quando realizamos uma contração excêntrica as fibras musculares são alongadas ao mesmo tempo em que há pontes cruzadas de actina e miosina fortemente acopladas na presença de trifosfato de adenosina (ATP). Acredita-se que o que ocorre durante esta contração é a ruptura forçada deste acoplamento e de forma mecânica pelo alongamento e não pela hidrólise de ATP, assim ocorrendo maior tensionamento ao sarcolema e a proteínas ancoradas a esta membrana (FLITNEY; HIRST, 1978; ISNER-HOROBETI, 2013; HYLDAHL; HUBAL, 2014).

Figura 8 - Tipos de ações musculares.



$$\frac{\text{Torque muscular}}{\text{Torque da carga}} = 1 \text{ Contração isométrica}$$

$$> 1 \text{ Contração Concêntrica}$$

$$< 1 \text{ Contração Excêntrica}$$

Legenda: Caracterização dos tipos de contração muscular baseados no torque exercido pelos músculos flexores do cotovelo e da resistência presente pelo antebraço somado ao halter. Entende-se por torque sendo o valor absoluto do componente perpendicular do braço de força em relação ao eixo, vezes a distância que a resistência foi deslocada. Se o torque exercido pelo músculo for igual ao exercido pela carga/resistência haverá a contração isométrica. Caso haja diferença entre estes torques ocorrerá uma contração concêntrica ou excêntrica.

Fonte: Adaptado de Enoka (1996).

O tamanho da tensão desenvolvida pelas fibras musculares propaga-se a outras proteínas subsarcolemiais e estruturais do músculo como a desmina, que possui domínios de junção com miofilamentos de actina e também ao complexo proteico de anquirina e espectrina. Esta característica confere a desmina algumas funções, como manter a organização no sarcômero a cada ciclo contração-relaxamento, sendo necessárias para a miogênese durante a regeneração após lesão (é um marcador de células satélites ativas) e até mesmo para participar da transmissão de forças (tensão) a outros componentes proteicos estruturais e passivos como integrinas e a matrix extracelular (MEC) (BERTHIER; BLAINEAU, 1997; BOLDRIN; MUNTONI; MORGAN, 2010; HYLDAHL; HUBAL, 2014).

A membrana celular pode aumentar sua permeabilidade a cálcio (Ca^{2+}) e este ativar calpains após ocorrerem contrações vigorosas ou também contrações excêntricas. Onde a resultante é proteólise e perda de força temporária (PAULSEN et al., 2012; HYLDAHL; HUBAL, 2014). Este aumento na permeabilidade pode contribuir na dor muscular de início tardio, que também pode ser induzida após perturbações homeostáticas no sarcômero promovidas pelo EE ou qualquer outro

treinamento em que o indivíduo não esteja adaptado (HOWATSON; SOMEREN, 2008; HYLDAHL; HUBAL, 2014).

Apesar das evidências apontarem que o EE promove dano muscular, cabe ressaltar que os estudos utilizam protocolos extremos para observar os fenômenos da dor muscular. Mesmo assim, sucessivas repetições de treinamento de EE ou outros exercícios que podem induzir dor muscular, tornam a musculatura cada vez mais adaptada a estes estímulos. Observações utilizando marcadores como a própria força, dor muscular e as concentrações de enzimas sarcoplasmáticas como a creatina cinase (CK) demonstram que a exposição a estes protocolos de exercício primeiramente exacerba tais fenômenos. No entanto, já na segunda vez que os indivíduos executaram o EE foi observado que a concentração de CK estava significativamente menor quando comparado aos valores 24 e 48 horas após a primeira execução de EE. Quando verificado o limiar sensorial percebeu-se que quando comparado o dia posterior ao EE, apenas após o segundo treino o limiar demonstrou não diminuir (PARK et al., 2011; HOSSEINZADEH et al. 2013; HYLDAHL; HUBAL, 2014).

Acredita-se que este efeito de sessões repetidas seja mediado por adaptações neurais e mecânicas após o EE. Como a distribuição mais homogênea entre as fibras musculares do estresse mecânico imposto pelo EE, assim possivelmente há a redução de dano específico em fibras de contração rápida. Outros motivos seriam a própria hipertrofia, ganho de força e remodelamento da MEC, citoesqueleto e tecido conectivo muscular (LAPIER et al., 1985; LIEBER; FRIDÉN, 1999; BARASH et al., 2002; ISNER-HOROBETI et al., 2013). Na MEC o seu remodelamento acompanha uma reposta anabólica caracterizada por aumento na expressão de colágeno, laminina e fatores de crescimento derivados da MEC, como o IGF-1 e o fator de crescimento transformador- β . Apesar de participar na mecanotransdução e transmissão de tensão aos componentes estruturais o seu papel no efeito de sessões repetidas não está esclarecido (HYLDAHL; HUBAL, 2014).

Aguiar e colaboradores (2008b) verificaram que camundongos submetidos a um programa de exercícios realizados em esteira rolante, porém com declínio (reproduzindo um exercício de corrida descendo uma ladeira) conhecido como *Downhill Running* (corrida excêntrica), houve um aumento nas expressões BDNF no hipocampo e corpo estriado, que são estruturas centrais. Tal observação não aconteceu no córtex cerebral e parece ser dependente do sítio, intensidade e volume do treino (KIM, 2005; PLOUGHMAN, 2005; AGUIAR, 2007; 2008a),

mas demonstra que este tipo de exercício também pode influenciar nos níveis de fatores de crescimento no sistema nervoso.

Populações com diferentes doenças ou déficits neuromusculares podem ser potencialmente alvos para a aplicação de EE. No caso de idosos com progressiva perda de massa magra, o treinamento resistido (o EE é um componente das contrações neste método) tem mostrado bons resultados na prevenção desta perda e também no ganho de força. Outro ponto é a osteopenia e fragilidade a quedas, em que o EE aumenta a densidade óssea e a habilidade de idosos exercerem contrações controladas e estáveis (LASTAYO et al., 2003; LASTAYO et al., 2010; ISNER-HOROBETI et al., 2013; HYLDAHL; HUBAL, 2014).

Os ganhos de força e volume muscular são achados em pacientes com distúrbios neuromusculares como Parkinson e Esclerose Múltipla. Um ponto importante para estas populações é que o custo energético do EE é baixo, permitindo uma melhor tolerância durante o treinamento. Cabe ressaltar que a severidade irá intervir na capacidade de que os ganhos em força sejam traduzidos em melhora da capacidade funcional. Em doenças metabólicas como o diabetes mellitus II a adição de EE ao programa de exercícios aeróbios potencializou o efeito sobre a tolerância a glicose e hemoglobina glicada reduzindo ambos. Quanto a redução de dor, os estudos abrangeram apenas a ação do EE em síndromes inflamatórias no aparelho locomotor, demonstrando que o treinamento baseado em EE promoveu redução significativa da dor (ISNER-HOROBETI et al., 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do treinamento de Exercício Excêntrico (EE) na dor e regeneração nervosa induzida por lesão traumática do nervo isquiático em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de diferentes protocolos de exercício excêntrico em animais submetidos ao esmagamento do nervo isquiático:
- Na recuperação funcional motora e sensorial;
- Na recuperação morfológica do nervo isquiático;
- No parâmetro bioquímico relacionado ao aumento ou redução da concentração de IGF-1, citocinas anti- e pro-inflamatórias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

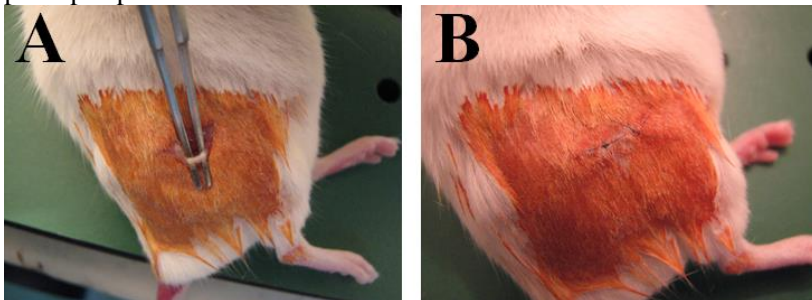
Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Neurociência Experimental (LaNEx) da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), no período matutino, usando camundongos *Swiss* machos (30 a 35 g) com idade de 45-60 dias, obtidos do Biotério da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), aclimatados 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 na sala de experimentação por pelo menos 1h antes dos testes e foram usados somente uma vez em cada experimento. Projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNISUL, sob o registro 13.011.4.08.IV.

4.2 PROCEDIMENTO DE ESMAGAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO

Para realização do procedimento de lesão do nervo isquiático, os animais foram anestesiados por meio de uma injeção intraperitoneal (i.p.) contendo uma mistura de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Então o estado de consciência do animal foi verificado com um pinçamento de pregas interdigitais e da cauda. Após este procedimento foi realizada a tricotomia da coxa direita, onde posteriormente passou por assepsia com anti-séptico (Povidine®).

Uma incisão na altura do trocanter maior foi efetuada para acesso e divulsão dos músculos bíceps femoral e vasto lateral. Assim, o nervo isquiático foi exposto e esmagado com o auxílio de uma pinça hemostática não-serrilhada por 30 segundos no primeiro estágio da gramalheira da pinça e aproximadamente 10 mm acima da trifurcação do nervo (CIDRAL-FILHO et al., 2013). Logo após, o nervo, músculos e fáscias foram reposicionados e a pele foi suturada por dois pontos de sutura com fio absorvível (Ethicon, 4-0) (Fig. 9). Após a cirurgia, os animais permaneceram próximos a uma lâmpada acessa como fonte de calor até retornarem a deambular pela caixa, retornando então ao biotério do laboratório.

Figura 9 - Exposição cirúrgica do nervo isquiático direito e sutura da pele após procedimento.



Legenda: Em (A) observa-se a incisão e exposição do nervo isquiático realizada após assepsia. Após o esmagamento do nervo, há o retorno deste a sua posição anatômica e posterior sutura da pele observado em (B).

Fonte: Elaboração do autor, 2015.

4.3 PROTOCOLOS DE TREINAMENTO DE EXERCÍCIO EXCÊNTRICO

4.3.1 Experimento crônico

Inicialmente, todos os animais foram submetidos a uma semana de familiarização a esteira rolante. Os camundongos foram submetidos na primeira semana a um treino durante cinco dias de 10 minutos a uma velocidade de 5 m/min em esteira sem declínio. Após este período, os animais dos grupos experimentais foram submetidos à cirurgia de esmagamento do nervo isquiático ou falsa-cirurgia, portanto os grupos exercitados iniciaram ao 7º dia de pós-operatório um programa de exercício excêntrico (EE) contínuo baseado no estudo de Aguiar e colaboradores (2007) que foi realizado em esteira ajustada em declínio de -16° (graus), uma vez ao dia, durante cinco dias por semana, por um período de oito semanas, totalizando 40 dias de treinamento. A duração das sessões foi de 30 minutos. Neste primeiro experimento foram utilizados 5 grupos de animais com $n = 8$, descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Grupos experimentais experimento crônico.

GRUPO	Tratamento	<i>n</i>	Dias	Freq. sem.	Veloc. (m/min)	Tempo (min)	Inclinação (graus)
1	<i>Sham</i>	8	-	-	-	-	-
2	<i>Crush</i> ou Operado	8	-	-	-	-	-
3	EE 6	8	40	5x	6	30	-16
4	EE 10	8	40	5x	10	30	-16
5	EE 14	8	40	5x	14	30	-16

Legenda: *Sham* = Falso-operado; EE 6 = operado/*crush* + exercício excêntrico a 6 m/min; EE 10 = operado/*crush* + exercício excêntrico a 10 m/min; EE 14 = operado/*crush* + exercício excêntrico a 14 m/min.

4.3.2 Experimentos agudos

Para a realização dos experimento agudos, os animais foram submetidos à habituação conforme descrita no item 4.2.1. Após este período, os animais dos grupos experimentais foram submetidos à cirurgia de esmagamento do nervo isquiático ou falsa-cirurgia, e posteriormente, os grupos exercitados iniciaram no 7º dia pós-operatório um programa de EE contínuo em esteira ajustada em declínio de -16º (graus), uma vez ao dia, durante cinco dias por semana, por um período de 1 semana, totalizando 5 dias de treinamento. A duração das sessões foi de 30 minutos. Neste segundo experimento foram utilizados 4 grupos de animais com *n* = 8, conforme pode ser visualizado na tabela 2.

Tabela 2 - Grupos experimentais experimento agudo.

GRUPO	Tratamento	<i>n</i>	Dias	Freq. sem.	Veloc. (m/min)	Tempo (min)	Inclinação (graus)
1	<i>Sham</i>	8	-	-	-	-	-
2	<i>Sham</i> +EE 14	8	5	5x	14	30	-16
3	<i>Crush</i> ou Operado	8	-	-	-	-	-
4	EE 14	8	5	5x	14	30	-16

Legenda: *Sham* = Falso-operado; EE 14 = operado/*crush* + exercício excêntrico a 14 m/min.

Figura 10 - Animais na esteira.



Legenda: A esteira rolante utilizada foi uma esteira convencional para humanos e adaptada com raiais de acrílico.

Fonte: Elaboração do autor, 2015.

4.3.3 Caracterização bioquímica do EE

Em outra série de experimentos, foi avaliado a concentração de lactato em camundongos de 45 dias com a maior intensidade prevista no estudo (14 m/min). Para isto, o sangue foi coletado ($\sim 0,7 \mu\text{L}$) na ponta da cauda dos animais após um pequeno corte realizado com tesoura cirúrgica, nos tempos zero (basal), 10 e 30 minutos de corrida, respectivamente. A concentração de lactato sanguíneo foi analisada em lactímetro portátil *Lactate Plus* (Nova Biomedical Corporation, MA) (Figura 11).

Para este experimento foram utilizados 16 animais divididos em dois grupos: Exercício em esteira sem declínio (0°) e; Exercício excêntrico em esteira (-16°).

Figura 11 - Lactímetro para o experimento de verificação da intensidade do EE em esteira.



Fonte: google.com.br

4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

4.4.1 Hiperalgesia mecânica

A hiperalgesia mecânica foi avaliada utilizando monofilamentos de von Frey (vF) como previamente descrito (MEOTTI et al., 2006). Os valores percentuais referentes à frequência de retirada da pata, frente a 10 estimulações da pata posterior direita com o monofilamento de von Frey (0,6 g) (VFH, Stoelting, Chicago, USA), foram considerados como indicativo de hiperalgesia mecânica. No dia anterior à cirurgia, os animais foram submetidos ao teste de vF para caracterização da resposta basal. Apenas os animais que apresentaram uma porcentagem de resposta em torno de 20% foram selecionados.

O teste foi aplicado utilizando uma plataforma de (70 x 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 x 7 x 11 cm), sem fundo e coberta com tampa, posicionada sobre a plataforma (BORTALANZA et al., 2002; MEOTTI et al., 2006).

O filamento foi aplicado na pata posterior direita (operada), atendendo alguns critérios como: aplicação feita perpendicularmente à superfície plantar, com pressão suficiente para proporcionar a curvatura do filamento, obtendo-se assim pressão total; os animais foram

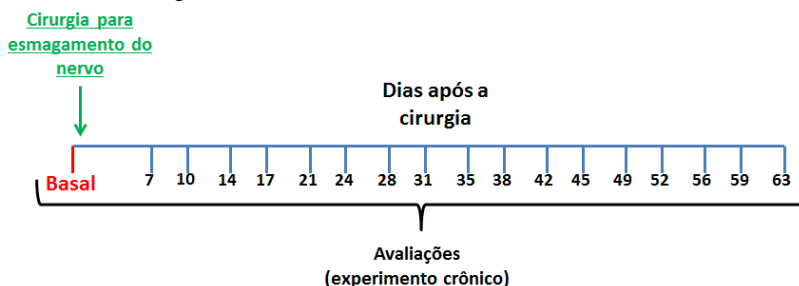
avaliados quando as quatro patas estiveram acomodadas sobre a tela; a resposta de retirada foi considerada quando o animal removeu totalmente a pata da tela de apoio (Fig. 12).

Figura 12 - Aparato utilizado e acomodação do animal para o teste com o monofilamento de von Frey.



Fonte: Elaboração do autor, 2015.

Figura 13 - Linha do tempo com as avaliações para hiperalgesia mecânica no experimento crônico.



Legenda: Após avaliação basal e randomização dos grupos, os animais foram submetidos ao procedimento de esmagamento do nervo isquiático direito. Então, a cada semana foi realizado decurso temporal até que não houvesse diferenças entre animais controles e tratados, como também perda do efeito das sessões de treinamento sobre a hiperalgesia mecânica. Fonte: Elaboração do autor, 2015.

4.4.2 Hiperalgisia ao frio

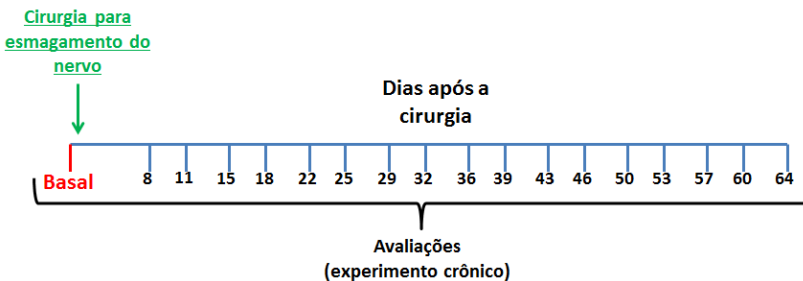
Para avaliação da resposta ao estímulo térmico frio foi utilizado o teste da acetona como previamente descrito por Choi e colaboradores (1988), com pequenas adaptações a camundongos. Uma borrifada de 20 µl de acetona foi aplicada na superfície plantar da pata posterior direita dos animais, e conseqüentemente a latência (segundos) de comportamento hiperalgésico, caracterizado como o comportamento de morder, lamber, e/ou agitar a pata direita, foi registrado por um período de 1 minuto.

Figura 14 - Teste da acetona.



Fonte: Elaboração do autor, 2015.

Figura 15 - Linha do tempo das avaliações de hiperalgisia ao frio.



Legenda: Após avaliação basal e randomização dos grupos, os animais foram submetidos ao procedimento de esmagamento do nervo isquiático direito. Então, a cada semana foi realizado decurso temporal até que não houvesse diferenças entre animais controles e tratados ou também se observado perda do

efeito das sessões de treinamento sobre a hiperalgesia ao frio. Fonte: Elaboração do autor, 2015.

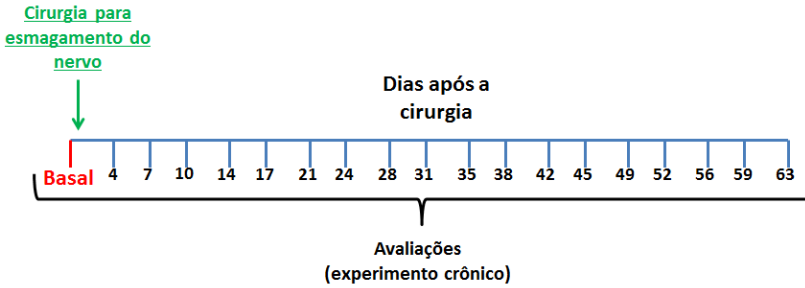
4.4.3 Avaliação da recuperação funcional motora

4.4.3.1 Índice Funcional e Estático do Isquiático

A função motora foi avaliada através do Índice Funcional do Isquiático (IFI) e Estático do Isquiático (IEI). Mensurações dos parâmetros PL (comprimento da pegada, do inglês, *print length*) e TS (abertura total dos dedos, do inglês, *total spread of toes*) foram coletadas do lado normal (não-operado) e do lado operado. O IFI foi calculado como no estudo de Inserra e colaboradores (1998) de acordo com a seguinte equação: $IFI = 118.9 \times TSF - 51.2 \times PLF - 7.5$. O IEI foi calculado como descrito por Baptista e colaboradores (2007) de acordo com a seguinte equação: $IEI = 101.3 \times TSF - 54.03 \times PLF - 9.5$. Os valores do IFI e IEI variam de zero a menos cem (0-100), onde zero representa a função normal em ambos os lados, e menos cem representa déficit funcional total.

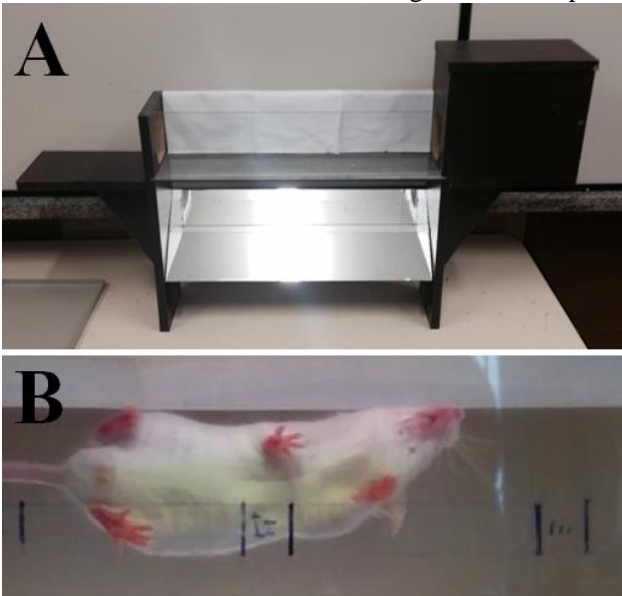
Para aquisição das imagens para obtenção do IFI e IEI, utilizou-se uma pista de marcha de vidro com bordas de madeira, com dimensões de 48 x 4,5 cm (BAPTISTA, 2007). Uma lâmpada de 100 W foi posicionada com o foco direcionado, iluminando a imagem das pegadas do animal. No final do corredor havia uma caixa escura para induzir o animal a caminhar na direção da mesma. A captura das imagens da marcha dos animais foi obtida através de uma câmera digital da marca Sony, Cybershot®, posicionada abaixo da pista de marcha e de frente para um espelho inclinado a 45° permitindo a filmagem da parte inferior da pista de vidro (Fig. 17). Para as capturas das imagens do animal em repouso, o mesmo foi restritivamente mantido na própria pista de marcha, possibilitando a captura de suas imagens em posição estática. Através do *software* “MovieMaker” versão 2.0, as filmagens foram armazenadas (formato jpeg, 640 x 480 pixels / polegadas, taxa de amostragem 1096 Kbps) e analisadas “*off-line*”. Esta etapa consiste no isolamento de diversos quadros, contendo os momentos de interesse para a análise de marcha dos camundongos. Os quadros de interesse foram exportados para o programa “Image Pro Plus” (versão 6.0, *National Institute of Health*) para o cálculo dos parâmetros.

Figura 16 - Linha do tempo das avaliações do IFI e IEI.



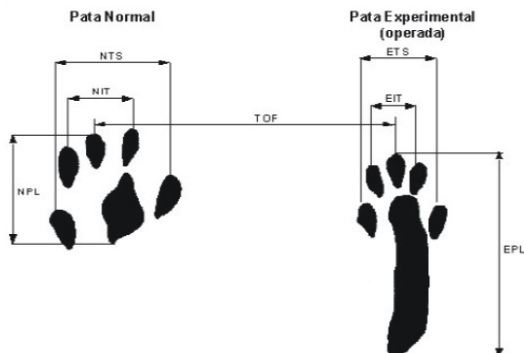
Legenda: Após avaliação basal e randomização dos grupos, os animais foram submetidos ao procedimento de esmagamento do nervo isquiático direito. Então, a cada semana sempre antes de irem para a esteira, foram realizadas as filmagens e calculados os índices até que não houvesse diferenças estatísticas entre os grupos experimentais. Fonte: Elaboração do autor, 2015.

Figura 17 - Pista de marcha de vidro e imagem utilizada para coleta.



Fonte: Elaboração do autor, 2015.

Figura 18 - Medidas para o cálculo dos índices.



Legenda: No presente estudo, o cálculo baseou-se apenas nas medidas da abertura total dos dedos (NTS e ETS) e no tamanho plantar (NFL e EPL) conforme Baptista e colaboradores (2007).

4.4.3.2 Avaliação da força e trofismo muscular

Para avaliar a recuperação funcional dos animais, também foi utilizado a mensuração da força de preensão. A força foi medida por meio de um dinamômetro digital (INSIGHT, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e foi realizada conforme descrito previamente por Kehl e colaboradores (2000) com pequenas modificações. Os animais foram contidos gentilmente e induzidos a agarrarem com apenas uma das patas posteriores a grade metálica do aparelho. Em seguida, o experimentador moveu o animal lentamente no sentido rostrocaudal até o animal soltar a grade. Três medidas de cada pata posterior foram registradas em gramas (g) e a média foi calculada. As coletas de força, bem como de peso corporal, foram registradas antes do esmagamento (basal) e durante as nove semanas seguintes, uma vez por semana. O cálculo de força relativa do membro experimental e controle em relação ao peso do animal [Força/Peso (g)] foi utilizado para tabulação e análise estatística.

Para avaliar o trofismo muscular, os animais foram sacrificados e o tríceps sural (músculos sóleo e gastrocnêmio) de ambos membros traseiros foram retirados e pesados (g) em balança eletrônica de precisão milesimal (BEL Engineering® SP, Brasil). Os valores absolutos foram relativizados [Peso do Tríceps Sural/Peso (g)] ao peso de cada animal e

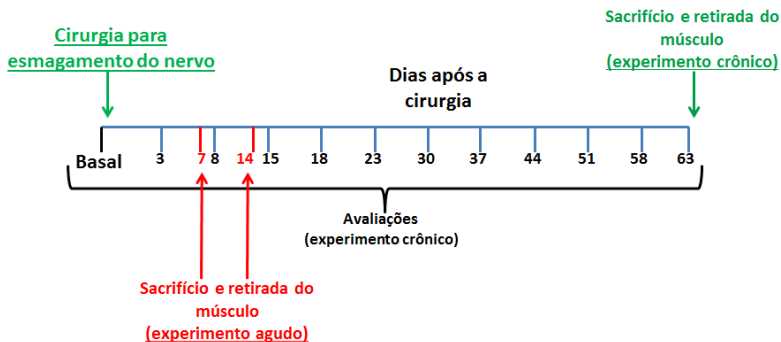
utilizados na estatística, a fim de verificar o efeito do esmagamento do nervo isquiático e a possível perda de massa magra no tríceps sural dos camundongos. Assim, este experimento mensurou o peso relativo deste grupo muscular 7 e 14 dias após o esmagamento do nervo. Também foi verificado o efeito de uma semana de EE sobre o peso do tríceps sural direito e esquerdo dos animais, verificado ao 14º dia após a lesão nervosa (experimento agudo). Essas medidas também foram realizadas ao final de 63 dias de experimento (experimento crônico) (Fig. 20).

Figura 19 - *Grip Strength* - equipamento para mensuração da força de agarrar.



Fonte: Elaboração do autor, 2015.

Figura 20 - Linha do tempo das avaliações de *Grip Force* e pesagem do tríceps sural direito e esquerdo.



Legenda: Após avaliações basais, os animais foram submetidos ao procedimento de esmagamento do nervo isquiático direito. Então, a cada semana sempre antes da sessão diária de EE, foram realizadas avaliações de *Grip Strength* até o final do experimento crônico. As coletas e pesagens do tríceps sural foram realizadas em três momentos: 7º e 14º (experimento agudo) ou 63º pós-operatório.

Fonte: Elaboração do autor, 2015.

4.5 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO NERVO ISQUIÁTICO

Nove semanas após o esmagamento do nervo isquiático, os camundongos foram eutanasiados e o nervo foi retirado através de uma nova incisão no mesmo local do procedimento inicial de esmagamento. As amostras foram fixadas em uma solução de formalina-zinco (cloreto de zinco 1,6%, formaldeído 4%, acetato de cálcio 20%) durante 24 h. Após a fixação, as amostras foram colocadas em dicromato de potássio a 5% por 5 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 realizada uma secção de um segmento do nervo de 5 mm, 3 mm distalmente à lesão. Depois de uma cuidadosa desidratação em etanol, utilizamos a metodologia de rotina, conforme Martins e colaboradores (2011), para a inclusão em parafina 58°C, utilizando como líquido intermediário o xilol e terminando nos seguintes passos:

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).

Uma vez incluído verticalmente em parafina e feitos seus blocos, os nervos foram cortados em um micrótomo Leica RM 2025 com espessura de 5 µm. Os cortes foram, portanto, 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 a técnica de Cason (CARGNIN-FERREIRA; SARASQUETE, 2008; MARTINS et al., 2011) e “*Oil Red*” (KIERNAN, 2004). As preparações histológicas foram dispostas numa solução de *Orange G* (1%), fucsina ácida (1%), azul de anilina (1%) e ácido fosfotúngstico (1%) durante 5 minutos e depois em solução hidroalcoólica “*Oil Red*” (1%) por 1 minuto. Posteriormente, as lâminas foram lavadas para retirada do excesso de corante, desidratadas e montadas em meio de montagem aquoso.

Depois de corados, os cortes foram fotografados com microscopia de luz e analisados no *Software* Chptool (Dep. de Informática - UFSC) onde três parâmetros foram quantificados:

densidade de fibras mielinizadas (fibras/mm²); área de fibras mielinizadas (%) e; área de tecido conjuntivo (%).

4.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.6.1 Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima - ELISA

Duas semanas após o esmagamento do nervo e vinte quatro horas após a última sessão de exercício, os animais do experimento agudo foram eutanasiados. Amostras de tecido do músculo (tríceps sural) e o nervo isquiático foram homogeneizados em solução de PBS (tampão fosfato-salino) contendo Tween 20 (0,05%), Fenilmetilsulfonilflúor (PMSF) 0,1 mM, EDTA 10 mM, aprotinina 2 ng/ml e cloreto de benzetônio 0,1 mM. Os homogenatos foram transferidos para tubos Eppendorfs de 1,5 ml, centrifugados a 6900 RPM a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi estocado a -80°C para análises posteriores.

O conteúdo total de proteína foi mensurado no sobrenadante pelo método de Bradford. Alíquotas de 10 µl das amostras foram utilizadas para mensurar os níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-4 (IL-4), antagonista do receptor de interleucina-1 (IL-1Ra) (Biolegend, San Diego, Estados Unidos da América) e IGF-1 (R&D Systems, Minneapolis, Estados Unidos da América) de acordo com as instruções do fabricante. Os valores obtidos foram estimados através da interpolação de uma curva padrão, utilizando-se ensaio colorimétrico medido à 450 nm (comprimento de onda de correção de 540 nm) em um leitor de placa de ELISA (Perlong DNM-9602, Nanjing Perlove Medical Equipment Co., Nanjing, China). Assim, todos os resultados foram expressos em picogramas de citocinas ou IGF-1 por miligrama de proteína (BOBINSKI et al, 2011).

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram analisados no programa Graph Pad Prism versão 5.0 (2005, La Jolla, Califórnia, EUA). Os dados apresentados possuem uma distribuição normal, de acordo com o teste de Shapiro – Wilk ($p > 0,05$). Desta forma, os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguido pelo teste pos-hoc de Student-Newman-Keuls ou Bonferroni, quando apropriado

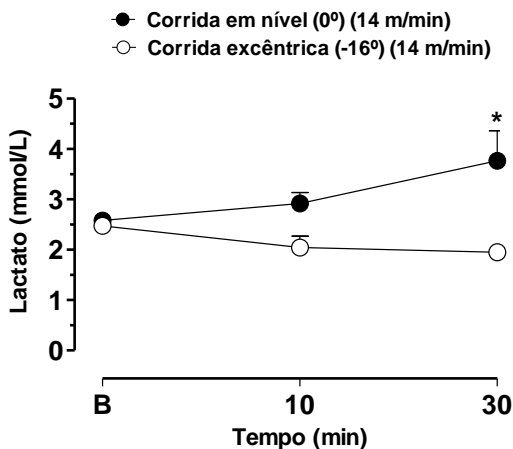
respectivamente. O teste t de Student não pareado unicaudal também foi utilizado quando apropriado. Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO EXERCÍCIO EXCÊNTRICO

Os dados apresentados na Figura 21 mostram a concentração de lactato dos animais submetidos a diferentes ângulos de posicionamento em esteira. Observa-se que a maior velocidade utilizada no estudo causou incrementos de $12 \pm 5\%$ e $32 \pm 4\%$ ao 10° e 30° minuto, respectivamente, para o grupo que realizou o teste em nível plano (0°). Já o grupo que foi submetido ao EE não demonstrou aumento na [La] durante os 30 minutos avaliados. Na comparação desta concentração ao 30° minuto pode-se observar que o grupo submetido à corrida em esteira declinada (-16°) possui uma [La] $48 \pm 4\%$ menor que o grupo da corrida em nível (0°) ($p < 0,05$).

Figura 21 - Execução de EE em esteira necessita de menor demanda fisiológica que a corrida em nível plano (0°).



Legenda: O gráfico demonstra duas curvas distintas entre os dois modos de corrida, sendo que a corrida em nível ($n = 8$) apresentou diferença significativa na [La] ao 30° minuto quando comparado ao exercício excêntrico ($n = 8$) em esteira ajustada na angulação de -16° . Os dados foram expressos com a média de 8 animais por grupo e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os dados foram submetidos à ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. O asterisco indica diferença significativa entre os grupos ao 30° minuto.

5.2 EFEITO DO EXERCÍCIO EXCÊNTRICO NA HIPERALGESIA MECÂNICA

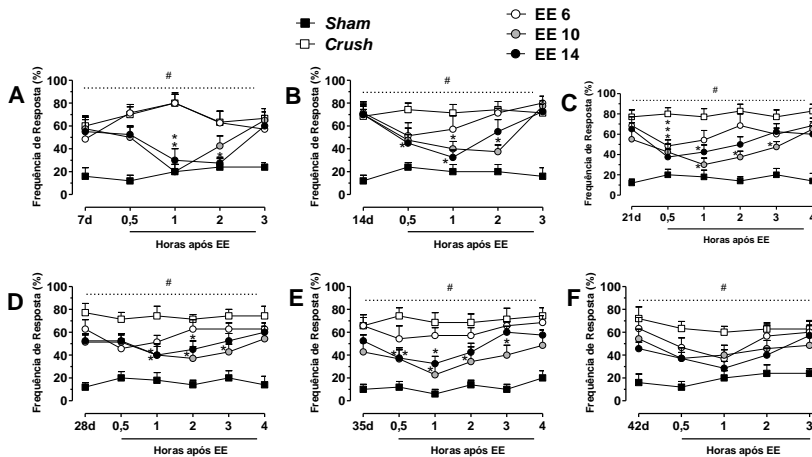
Na Figura 22, observam-se os decursos temporais realizados para observar o efeito de diferentes velocidades de EE na hiperalgesia mecânica após o esmagamento do nervo isquiático. Verificou-se um efeito dependente do EE, pois ao 7º dia pós-operatório os grupos exercitados em maiores velocidades exibiram médias de 20,0 e 30,0% na frequência de resposta, valores significativamente ($p < 0,05$) menores que o grupo não exercitado (média de 71,4%) apenas na primeira hora após o exercício (Fig. 22A).

Na semana posterior (14º dia PO), o efeito prolongou-se até duas horas (Fig. 22B) para o grupo exercitado a 10 m/min e apenas até uma hora para o exercitado a 14 m/min em comparação ao grupo operado e não-exercitado ($p < 0,05$). Tal efeito aumentou ($p < 0,05$) para estes dois grupos ao 21º, 28º, 35º dias PO, por até três horas após o EE para o grupo exercitado a 10 m/min e duas horas após para o exercitado a 14 m/min (Fig. 22C; D e; E).

Ao 42º dia PO, observa-se que em nenhum dos pontos do decurso temporal haviam diferenças entre o grupo *crush* e os tratados com EE ($p > 0,05$).

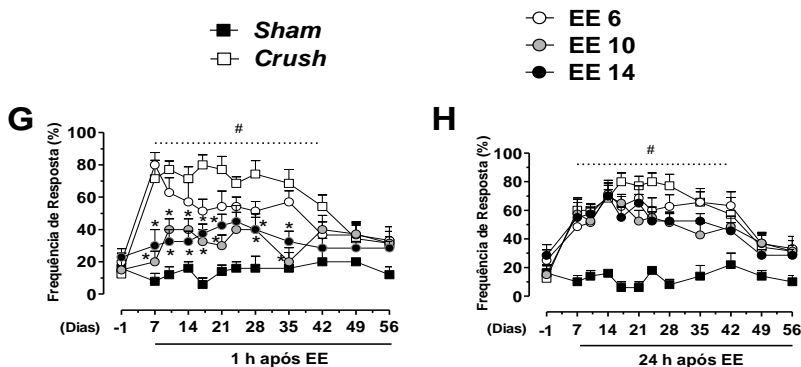
O grupo exercitado em velocidade mais lenta (6 m/min) não apresentou diferença significativa quando comparado com o grupo não-exercitado em nenhum dos tempos avaliados. Já o grupo *Sham* não demonstrou aumentos significativos na frequência de resposta, mesmo após a falsa cirurgia, demonstrando que os procedimentos cirúrgicos adotados foram bem aplicados. Logo, durante os tempos avaliados ocorreu diferenças significativas entre o grupo *Sham* e o operado. Este comportamento foi observado até o 42º dia PO (Fig. 22F, G, e H).

Figura 22 - Efeito de diferentes velocidades de EE sobre a hiperalgesia mecânica (Continua).



Legenda: Efeito agudo de diferentes intensidades do exercício excêntrico (EE) sobre a hiperalgesia mecânica no modelo de esmagamento do nervo isquiático. Após avaliação pré-exercício (sinalizado pelo respectivo dia pós-operatório nas abscissas) havia o tratamento com o EE seguido por avaliações em decurso temporal (A, B, C, D, E e F). Em (F) o último decurso temporal é mostrado, pois a partir deste decurso temporal o grupo *crush* e os exercitados exibiram frequência de resposta semelhante em todas as avaliações de von Frey (dados não mostrados). Uma redução aguda da hiperalgesia mecânica foi observada até o 35º dia apenas na compilação em (G), demonstrando um efeito transitente das sessões de EE sobre a hiperalgesia mecânica. Em (H) valores basais (-1 = antes dos procedimentos cirúrgicos) não diferem entre os grupos. Ao 7º PO observa-se diferença significativa ($\#p < 0,05$) entre o grupo operado e o grupo Sham que perdurou até o 42º pós operatório. O início do protocolo de EE ao 7º PO não reduziu os valores da frequência de resposta dos grupos exercitados em relação ao grupo operado 24h após o EE. Cada ponto está expresso em média e as linhas verticais representam o E.P.M. de 8 animais por grupo. A diferença entre grupo operado e grupos tratados com EE é indicada pelos asteriscos (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni, $\#$ ou $*p < 0,05$).

Figura 22 - Efeito de diferentes velocidades de EE sobre a hiperalgesia mecânica (Continuação).



Legenda: Efeito agudo de diferentes intensidades do exercício excêntrico (EE) sobre a hiperalgesia mecânica no modelo de esmagamento do nervo isquiático. Após avaliação pré-exercício (sinalizado pelo respectivo dia pós-operatório nas abscissas) havia o tratamento com o EE seguido por avaliações em decurso temporal (A, B, C, D, E e F). Em (F) o último decurso temporal é mostrado, pois a partir deste decurso temporal o grupo *crush* e os exercitados exibiram frequência de resposta semelhante em todas as avaliações de von Frey (dados não mostrados). Uma redução aguda da hiperalgesia mecânica foi observada até o 35º dia apenas na compilação em (G), demonstrando um efeito transitente das sessões de EE sobre a hiperalgesia mecânica. Em (H) valores basais (-1 = antes dos procedimentos cirúrgicos) não diferem entre os grupos. Ao 7º PO observa-se diferença significativa ($\#p < 0,05$) entre o grupo operado e o grupo *Sham* que perdurou até o 42º pós operatório. O início do protocolo de EE ao 7º PO não reduziu os valores da frequência de resposta dos grupos exercitados em relação ao grupo operado 24h após o EE. Cada ponto está expresso em média e as linhas verticais representam o E.P.M. de 8 animais por grupo. A diferença entre grupo operado e grupos tratados com EE é indicada pelos asteriscos (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni, # ou $*p < 0,05$).

A Figura 22G demonstra que as sessões de EE promoveram agudamente uma redução significativa da frequência de resposta apenas nos animais exercitados a 10 e a 14 m/min. Esta redução na hiperalgesia nestes grupos foi verificada até o 35º dia PO ($p < 0,05$). A partir deste dia, há uma redução nos valores dos animais *crush* e assim extinção da diferença entre animais operados não-exercitados e exercitados ($p < 0,05$).

Quando avaliados 24 horas após o EE, nenhum grupo apresentou diferença estatística ao longo do experimento quando comparados com o grupo operado não exercitado (Fig. 22H). Após o procedimento de esmagamento do nervo isquiático ficou evidente uma alteração da resposta no teste de von Frey ao longo do tempo em todos os grupos operados, onde a cerquilha denota diferença estatística ($p < 0,05$) entre o grupo *Sham* e o operado. Não houve diferença entre os animais operados exercitados e não-exercitados na avaliação de 24h após EE (Fig. 22H).

5.3 EFEITO DO EXERCÍCIO EXCÊNTRICO NA HIPERALGESIA AO FRIO

Diferentemente das avaliações para hiperalgesia mecânica, observou-se nas avaliações com exposição ao frio um efeito de redução na resposta hiperalgésica mais proeminente para todas as velocidades de EE. Exceto pelo primeiro decurso temporal realizado no 8º dia PO (Fig. 23A), em que se observou hiperalgesia reduzida até a primeira hora após o EE nos grupos Operado + EE 6 e Operado + EE 14 média de 1,16 e 1,22 segundos (s) respectivamente *vs.* 3,17 s no grupo Operado e não exercitado ($p < 0,05$) e até a segunda hora para o grupo Operado + EE 10 (1,52 s *vs.* 2,67 s) quando comparado ao grupo operado e não exercitado ($p < 0,05$).

Na figura 23B, podemos observar que ao 15º dia PO já havia um efeito das sessões de EE sobre a hiperalgesia para os grupos operados e exercitados. No grupo *crush* foi verificada uma resposta hiperalgésica média de 2,58 s, enquanto nos animais exercitados foram verificados valores de 1,68 s; 1,52 s e; 1,26 s ($p < 0,05$) já na avaliação pré-exercício.

Todos os outros decursos temporais (dados a partir do 15º dia PO não são mostrados) demonstram efeito de 24h das sessões de EE sobre a hiperalgesia ao frio, onde houve diferença significativa ($p < 0,05$) desde os valores pré-exercício. Este comportamento ocorreu e não foi interrompido até o fim do experimento.

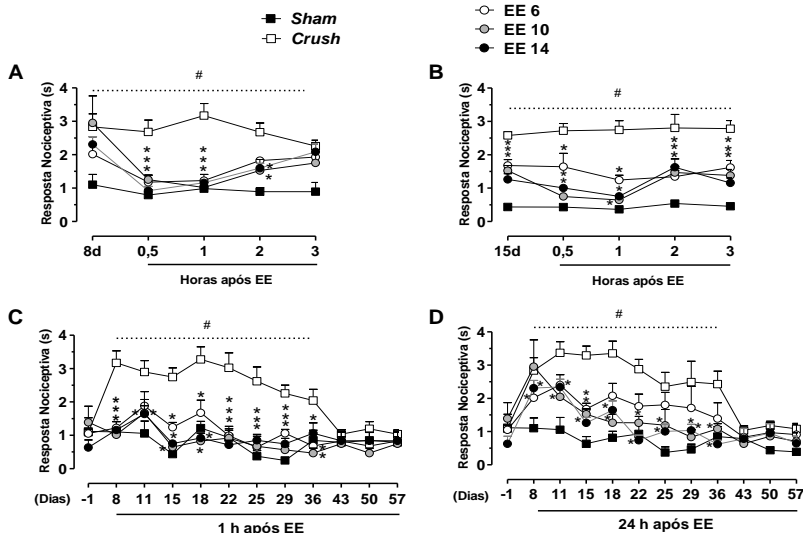
O efeito agudo das sessões de EE é observado na Figura 23C. Ficou claro que a execução de EE em esteira induziu redução na hiperalgesia dos animais em todos os grupos experimentais exercitados. A diferença entre estes grupos e o grupo Operado foi verificada até o 36º dia pós-operatório, pois após esta etapa do experimento os animais Operados não exibiam mais alteração sensorial decorrente da lesão nervosa periférica. Quando comparados aos animais *Sham*, as respostas

hiperalgésicas dos animais operados não mais demonstravam diferenças ao 43º dia PO ($p > 0,05$).

Na Figura 23D verifica-se o efeito de 24 horas das sessões de EE ou mesmo o efeito de 24h deste exercício. Apenas o grupo Operado+EE10 e +EE14 apresentaram redução na hiperalgesia ao longo do experimento quando comparado ao grupo Operado. No 11º dia pós-operatório foi verificado o primeiro dia com diferença significativa dos operados não-exercitados apenas em relação ao grupo Operado EE+10 (3,37 vs. 2,04 segundos, respectivamente; $p < 0,05$). Apenas ao 15º dia PO o grupo Operado + EE6 demonstrou redução na resposta hiperalgésica pré-exercício ($p < 0,05$).

Em sequência, tanto o grupo exercitado a 10 m/min quanto o grupo exercitado a 14 m/min passaram a exibir redução na hiperalgesia em relação ao Operado. Tal diferença calculada pela ANOVA de duas vias foi observada até o 29º dia pós-operatório para o grupo Operado+EE10 (0,83 s vs. 2,49 s para o Operado; $p < 0,05$) e até o 36º dia para o grupo Operado+EE14 (0,61 s vs. 2,43 s para o Operado; $p < 0,05$).

Figura 23 - Efeito de diferentes velocidades de EE sobre a hiperalgesia ao frio.



Legenda: Efeito agudo de diferentes intensidades de exercício excêntrico (EE) sobre a hiperalgesia térmica no modelo de esmagamento do nervo isquiático. Após avaliação pré-exercício (sinalizado pelo dia do experimento na abcissa) havia o tratamento com o EE seguido por avaliações em decurso temporal. (A) Ao 8° PO o decurso temporal demonstrou redução significativa na hiperalgesia por até 3h após o EE. No 15° PO (B) observa-se redução na hiperalgesia mesmo antes da sessão deste dia (24h após o último treino) nos grupos exercitados. Em (C) todos os grupos tratados demonstraram hiperalgesia reduzida uma hora após EE. Após a lesão nervosa, observa-se diferença significativa (# $p < 0,05$) entre o grupo operado e o grupo Sham que perdurou até o 36° pós operatório (D). Há praticamente o mesmo comportamento nas avaliações pré-exercício em relação aos grupos que realizaram EE a 10 e a 14 m/min (diferenças para o grupo Operado são indicadas por asterisco*). Entretanto, há primeiramente diferença apenas entre o grupo de 10 m/min para o grupo não-exercitado ao 11° PO, seguido de um período de resposta hiperalgésica reduzida semelhante entre o grupo exercitado a 10 e o 14 m/min. A última diferença entre um grupo operado e um grupo operado e exercitado ocorreu ao 36° P.O. apenas para o grupo 14m/min (D). Cada ponto está expresso em média e as linhas verticais representam o E.P.M. de 8 animais por grupo. A diferença entre grupo operado e grupos tratados com EE é indicada pelos asteriscos (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni, # ou * denotam $p < 0,05$).

5.4 EFEITO DO EE EM DIFERENTES VELOCIDADES NA RECUPERAÇÃO FUNCIONAL MOTORA

5.4.1 Índice Funcional do Isquiático e Índice Estático do isquiático

Com a avaliação feita utilizando os índices, notou-se que quatro dias após a lesão do nervo isquiático direito todos os grupos operados tiveram perda funcional de 100% ($p < 0,05$) em ambos os índices. No entanto, o grupo *Sham* não obteve qualquer comprometimento na função do nervo isquiático induzido pelo procedimento cirúrgico em nenhuma avaliação (Fig. 24A e B).

A partir do 10º dia PO verificou-se que os animais submetidos ao EE em esteira passaram a exibir uma recuperação motora mais acelerada que o grupo Operado no IEI (Fig. 24A). Neste dia do experimento, a comparação mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias percentuais dos grupos operados (-95% do grupo Operado vs. -71% Operado + EE 6; -65% Operado + EE 14 e; -51% Operado + EE 10).

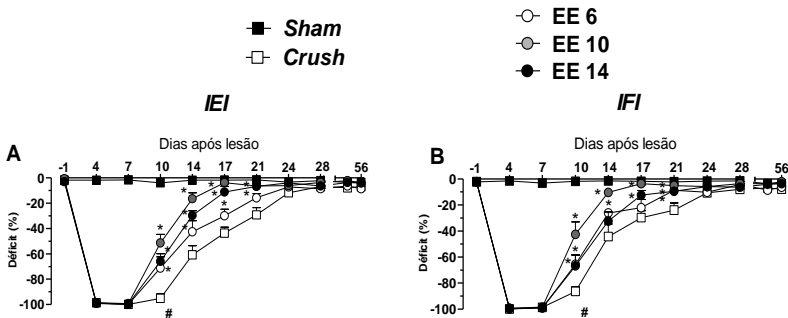
Ao 17º dia PO os grupos exercitados com maior velocidade (10 e 14 m/min) exibiram uma recuperação motora quase completa (-3% e -11%, respectivamente), ainda que ao mesmo tempo os animais do grupo operado + EE6 demonstravam diferença para o grupo Operado (-29% vs. -43%, respectivamente) no IEI ($p < 0,05$). Já no 21º dia PO, apenas os grupos Operado + EE 10 e + EE 14 apresentaram diferenças para o grupo Operado ($p < 0,05$), o qual observou-se uma recuperação natural (regeneração nervosa periférica), porém numa taxa aparentemente mais lenta. Após o dia do experimento, todos os grupos exibiam função motora semelhante perante o IEI.

Na análise do IFI (Fig. 24B) percebe-se um comportamento de recuperação da função do nervo isquiático semelhante ao IEI, onde destaca-se primeiramente o grupo Operado + EE10 que ao 10º dia PO (com apenas 3 sessões executadas) já havia proeminente recuperação motora (-42%). Os outros dois grupos exercitados obtiveram boa recuperação também, em que a média percentual de sua recuperação passou de próximo a -100% ao 7º dia PO para aproximadamente -66% no 10º dia PO.

Assim como no IEI, o IFI no 17º dia PO demonstrou que apenas os grupos que faziam o EE de maior velocidade, Operado + EE 10 e Operado + EE14, ainda apresentavam diferenças para o grupo Operado (-3% e -12% vs. -29%, respectivamente; $p < 0,05$). Esta diferença estendeu-se até o 21º dia PO, onde praticamente todos os grupos se

recuperaram do prévio comprometimento motor da marcha, exceto pelo grupo Operado o qual permanecia com déficit (-23% vs. -2% do grupo *Sham*; $p < 0,05$).

Figura 24 - Recuperação motora dos animais submetidos ao EE avaliada pelo IEI e IFI



Legenda: Lesão por esmagamento do nervo isquiático induz perda funcional para todos os grupos em ambos os índices. Cerquilhas demonstram diferença significativa entre o grupo *Sham* e o grupo operado ($\#p < 0,05$). Animais operados e submetidos ao EE (grupos EE6; EE10; EE14) aumentam seus índices funcionais significativamente mais rápido que o grupo operado durante a maior parte do experimento ($*p < 0,05$). Os dados foram apresentados com a média e as linhas verticais representam o E.P.M. de 8 animais por grupo e submetidos à ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. IFI = Índice Funcional do Isquiático; IEI = Índice Estático do Isquiático.

5.4.2 Força de preensão

Conforme pode ser observado na figura 25A, a lesão nervosa periférica levou a uma perda da força de preensão plantar da pata ipsilateral à lesão nervosa em todos os grupos que tiveram o nervo esmagado, quando comparados com o grupo *Sham*. Este decréscimo significativo na força foi observado até o 51º dia PO em relação ao grupo operado ($p < 0,05$). De acordo com o esperado, os animais submetidos ao EE nas velocidades maiores (10 e 14 m/min), demonstraram uma recuperação na força relativa mais acentuada e acelerada do que o grupo Operado e não exercitado após o 8º dia PO.

Ao 15º dia PO observamos que os grupos operados e exercitados demonstraram uma recuperação acelerada em relação ao grupo Operado,

com valores de $47 \pm 11\%$ maior para o grupo exercitado a 10 m/min e de $56 \pm 9\%$ para os exercitados a 6 e 14 m/min ($p < 0,05$).

Embora o grupo submetido ao EE a 6 m/min ter demonstrado recuperação acelerada no período inicial, no restante do experimento não houve mais diferenças significativas entre este grupo e o grupo operado e não exercitado ($p > 0,05$).

Os resultados verificados no 23º dia PO demonstram o padrão de que as maiores velocidades de EE aceleram a recuperação motora. Aqui a diferença dos grupos exercitados a 10 e 14 m/min em relação ao *crush* é de $24 \pm 6\%$ ($p < 0,05$). Já no 30º dia apenas o grupo exercitado a 14 m/min demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$) para o *crush*, $21 \pm 4\%$. No entanto, ambas as velocidades voltaram a demonstrar diferenças em torno de $24 \pm 3\%$ para o *crush* até o 51º PO ($p < 0,05$).

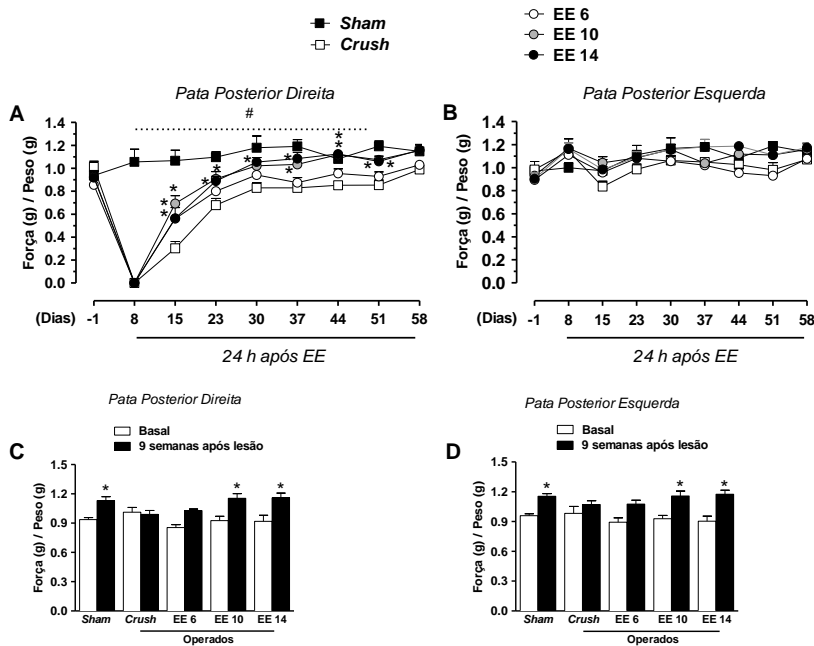
A força relativa ao peso da pata contralateral à lesão foi também avaliada. Observando os dados obtidos, nota-se que não houve comprometimento ou mesmo aumento de força apesar de pequenas variações (Fig. 25B).

Na figura 25C e 25D podemos observar a comparação entre a força relativa de todos os grupos no início e após o período de nove semanas de experimento. O grupo *Sham* e não exercitado demonstrou aumento *per se* da força de preensão relativa tanto para o lado direito ($17 \pm 2\%$) quanto para o lado esquerdo ($17 \pm 2\%$) ($p < 0,05$). Já no grupo Operado foi verificada uma força relativa semelhante ao início e ao final do experimento.

Em todos os grupos exercitados houve aumento da força relativa em relação ao início do experimento (basal). No entanto, o aumento ocorrido no grupo exercitado a 6 m/min não foi estatisticamente diferente para ambas as patas ($17 \pm 4\%$ à direita e à esquerda, $p > 0,05$).

Nas maiores velocidades aconteceram os maiores aumentos na força de pressão relativa. O grupo que foi exercitado a 10 m/min ocorreu um aumento de $20 \pm 4\%$ na pata direita e $20 \pm 3\%$ na pata esquerda ($p < 0,05$). E o grupo exercitado a 14 m/min obteve aumento de $21 \pm 5\%$ na pata direita e $23 \pm 4\%$ na pata esquerda ($p < 0,05$).

Figura 25 - Efeito de diferentes velocidades de EE sobre a força de preensão.



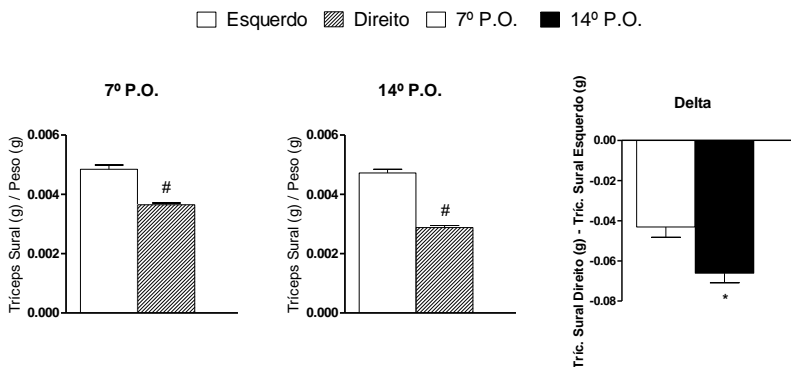
Legenda: Dados de força relativa (razão da força de preensão obtida no teste dividida pelo peso do próprio animal) demonstram uma redução significativa após a lesão no nervo isquiático direito (A). A cerquilha (#) denota diferença entre grupo *Sham* e grupo operado ($p < 0,05$). Ao 15º dia diferenças significantes foram observadas entre os grupos exercitados em maiores intensidades e o grupo *crush*, indicada pelo asterisco ($*p < 0,05$). O lado contralateral não foi afetado de alguma forma pela lesão nervosa (B). Os dados são demonstrados até que não houvesse diferenças estatísticas entre os grupos operado e *Sham*. Os dados obtidos nove semana após a lesão demonstram que dois dos grupos operados tiveram a força relativa ao peso comprometida parcialmente pela lesão nervosa. Aqui os asteriscos indicam diferença em relação ao grupo operado e não-exercitado (A) ou à medida basal (C e D). Os dados foram expressos em média e as linhas verticais representam o E.P.M. de 8 animais por grupo e submetidos à *two-way* ou ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni ou Newman-Keuls, respectivamente.

5.4.3 Peso muscular

A fim de verificar o impacto da lesão nervosa sobre a musculatura inervada pelo isquiático, os tríceps surais foram pesados ao 7º e 14º dia PO. Como observado na figura 26A, podemos verificar a significativa perda do peso relativo do tríceps sural direito, já sete dias após a lesão, em relação ao tríceps sural esquerdo ($-25 \pm 1\%$, $p < 0,05$). Ao 14º dia pós-operatório ainda há mais decréscimo quando comparado musculatura direita e esquerda ($-39 \pm 1\%$, $p < 0,05$) (Fig. 26B).

Quando calculado o delta entre o peso destes músculos é notório a perda progressiva do peso do tríceps sural direito, onde se verifica uma perda de $35 \pm 8\%$ ($p < 0,05\%$) do peso do tríceps sural direito, em termos absolutos, do 7º ao 14º dia pós-operatório (Figura 26C).

Figura 26 - Lesão compressiva do nervo isquiático induz perda de massa no Tríceps Sural.



Legenda: Após cirurgia de esmagamento do nervo isquiático direito, os animais foram sacrificados no 7º ou 14º dias pós-operatório. Perda significativa ($\#p < 0,05$) da massa no tríceps sural do lado experimental é observada no gráfico A e B quando comparado o com tríceps sural contralateral. Em C, os valores de perda de massa magra progrediram quando comparado o 14º com o 7º pós-operatório ($*p < 0,05$). Dados expressos em média e E.P.M. de 8 animais por grupo e testados com o Teste *t* de Student não-pareado unicaudal.

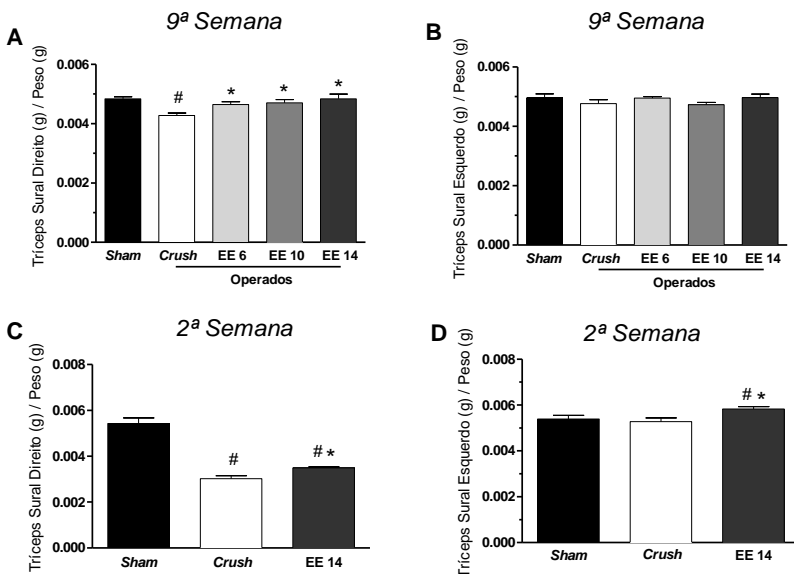
Como ilustrado na figura 27A, houve um decréscimo de $12 \pm 2\%$ ($p < 0,05$) no peso do tríceps sural do grupo Operado quando comparado com o grupo ao *Sham*, mesmo nove semanas após a lesão nervosa.

Outrossim, os grupos de animais operados e submetidos ao EE demonstraram aumento da massa muscular quando comparado com o grupo Operado. Os animais dos grupos Operado + EE 6, Operado + EE 10 e Operado + EE 14, apresentaram valores de 8 ± 2 , 10 ± 3 e $12 \pm 3\%$, respectivamente, maior que o grupo Operado ($p < 0,05$). Entretanto, no lado contralateral à lesão, observa-se na figura 27B, que não foi verificada diferenças no peso do tríceps sural entre os grupos experimentais.

Ao 14º dia PO e após apenas cinco sessões de EE foi verificado o peso relativo do músculo dos animais operados não-exercitados e exercitados. Na figura 27C pode-se observar uma recuperação significativa para o grupo operado e exercitado a 14 m/min em relação ao operado e não-exercitado. Tal aumento no peso induzido por cinco sessões de EE em esteira foi de $14 \pm 4\%$ ($p < 0,05$).

Na figura 27D, observa-se que na musculatura do lado contralateral à lesão nervosa ocorreu aumento de seu peso em relação aos outros grupos experimentais no 14º dia PO. A estatística demonstrou que o grupo operado + EE14 obteve $8 \pm 3\%$ mais pesado que os animais *Sham* e $9 \pm 3\%$ que o grupo operado ($p < 0,05$).

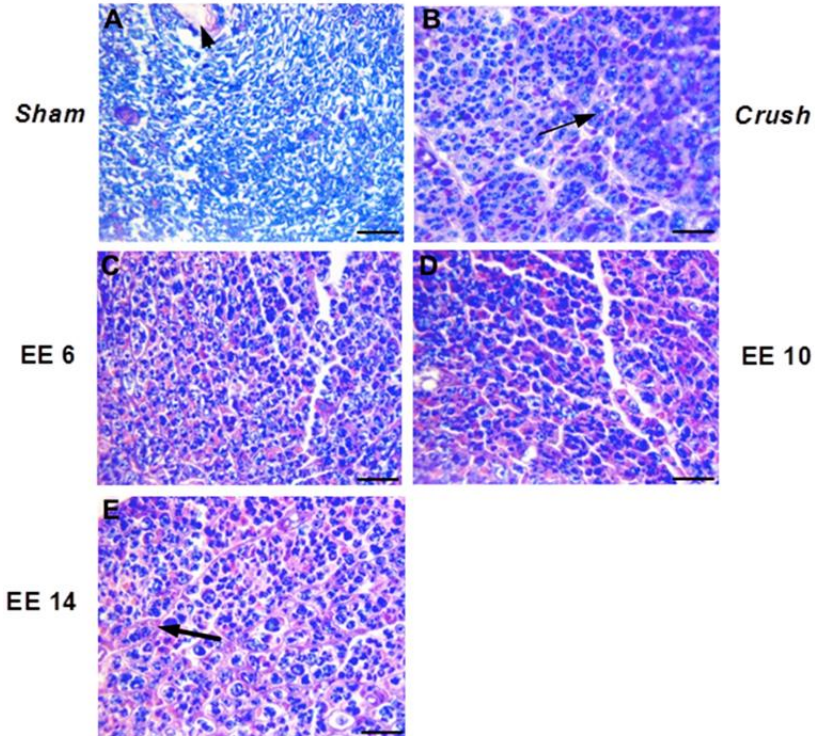
Figura 27 - EE recupera o peso do tríceps sural após esmagamento do nervo isquiático.



Legenda: Duas semanas após cirurgia de esmagamento do nervo isquiático direito, foi verificado o peso do tríceps sural e feita uma razão pelo peso dos próprios animais. (A) Os grupo operados perderam uma quantidade significativa de massa magra ($\#p < 0,05$). Entretanto o grupo operado+EE14 que foi submetido ao EE durante cinco dias, iniciando ao 7º pós-operatorio, apresentou maior massa no lado experimental que o grupo somente operado (e não exercitado). Essa significativa reversão parcial na perda de massa é indicada pelo asterisco ($*p < 0,05$). Em B, é observado aumento na massa no lado contralateral à lesão nervosa em relação aos grupos Sham e operado (indicado por # e * respectivamente, $p < 0,05$). Após cumprirem o protocolo de 40 sessões de EE os grupos operados foram sacrificados e o peso do tríceps sural foi verificada e racionalizada pelo peso do animal. Este dado (C) demonstra primeiramente que o grupo operado, mesmo após nove semanas após o procedimento de esmagamento do nervo isquiático permaneceu com a massa do tríceps reduzida (a cerquilha indica diferença para o grupo Sham, $\#p < 0,05$). Em todos os outros grupos foi verificado maior massa no lado experimental em relação ao grupo apenas operado ($*p < 0,05$). Já no lado contralateral não evidenciou-se diferenças entre os grupos (D). Dados expressos em média e E.P.M. de 8 animais por grupo e submetidos à ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls.

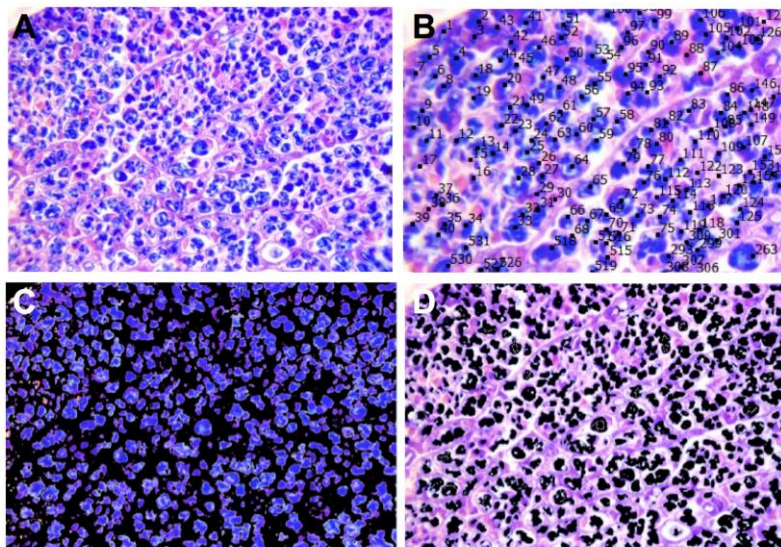
5.5 EFEITO DO EE SOBRE A RECUPERAÇÃO MORFOLÓGICA DO NERVO ISQUIÁTICO

Figura 28 - Histologia do nervo isquiático.



Legenda: Imagens de cortes transversais do nervo isquiático dos grupos após nove semanas de experimento no aumento de 100x. (A) Na imagem dos animais submetidos à falsa cirurgia podemos observar intensa coloração de mielina pela coloração azul, indicando que não há alterações. A cabeça de seta demonstra um vaso sanguíneo. A seta mais fina demonstra (B) a coloração da mielina e a mais grossa (E) do tecido conjuntivo. As figuras B, C, D e E representam os grupos *Crush*, EE 6, EE 10 e EE 14, respectivamente. Barras pretas representam a escala de 5 μm .

Figura 29 - Análise morfométrica do nervo isquiático.



Legenda: Na imagem (A) observamos um corte transversal do nervo isquiático, que está ampliado em (B) para melhor visualização e quantificação. Nesta imagem, observamos a quantificação de fibras mielinizadas. Em (C) destacamos a quantidade de axônios mielinizados na imagem para quantificação da área de tecido mielinizado. A imagem (D) foi utilizada para quantificação da área de tecido conjuntivo.

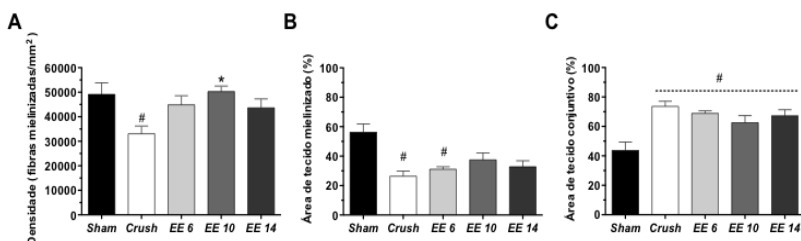
Na avaliação morfométrica dos nervos após nove semanas de experimento na análise do parâmetro relacionado a densidade de fibras mielinizadas (Fig. 28, 29 e 30A) os animais operados e não-exercitados apresentaram uma redução de $33 \pm 6\%$ induzida pela lesão ($p < 0,05$) quando comparados com o grupo *Sham*. Os grupos operados e exercitados obtiveram diferentes quantidades de fibras mielinizadas. Os grupos exercitados a 6 m/min e 14 m/min demonstraram ainda uma redução de $9 \pm 7\%$ e $11 \pm 7\%$, respectivamente, em relação ao *Sham* ($p > 0,05$). Já no grupo exercitado a 10 m/min foi encontrado um aumento de $2 \pm 5\%$ em relação ao grupo *Sham* ($p > 0,05$) e ainda apresentou um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo *Crush*.

A análise da porcentagem da área de tecido mielinizado nos cortes transversais de nervo isquiático (Fig. 28, 29 e 30B) demonstra

que apenas os grupos operado (*crush*) e operado + EE a 6 m/min apresentam reduções de $56 \pm 3\%$ e $44 \pm 3\%$ ($p < 0,05$), respectivamente, em relação ao *Sham*. Nos grupos operados e exercitados a 10 e 14 m/min foi encontrado respectivamente reduções de $33 \pm 9\%$ e $41 \pm 7\%$ ($p > 0,05$). Apesar dos valores não serem estatisticamente significativos, os grupos operados e exercitados a 10 e 14 m/min apresentaram um aumento de 23% e 15% quando comparados com o grupo *Crush*.

No tecido conjuntivo encontrado (Fig. 28, 29 e 30C) nos nervos isquiáticos foi verificado que todos os grupos operados obtiveram aumento significativo, mesmo após nove semanas de experimento. Em relação ao *Sham* estes aumentos foram de $68 \pm 8\%$ para o grupo *Crush*, $58 \pm 4\%$ no EE 6, $43 \pm 11\%$ no EE 10 e $54 \pm 9\%$ no EE 14 ($p < 0,05$).

Figura 30 - Efeito do EE sobre parâmetros morfométricos da regeneração nervosa.



Legenda: Os gráficos acima revelam a influência do treinamento de EE de oito semanas sobre parâmetros morfométricos após esmagamento do nervo isquiático. (A) Os gráficos demonstram a densidade de fibras mielinizadas/mm²; (B) a área de tecido mielinizado em relação ao grupo *Sham* (100%) e; a área de tecido conjuntivo de cada grupo (C). As cerquilhas indicam diferenças entre os grupos operados e o *Sham* ($p < 0,05$) e os asteriscos indicam diferenças entre os grupos operados ($p < 0,05$). Valores expressos em média e E.P.M. de 5 animais por grupo e submetidos à ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls.

5.6 EFEITO DO EE EM DIFERENTES VELOCIDADES NA CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS

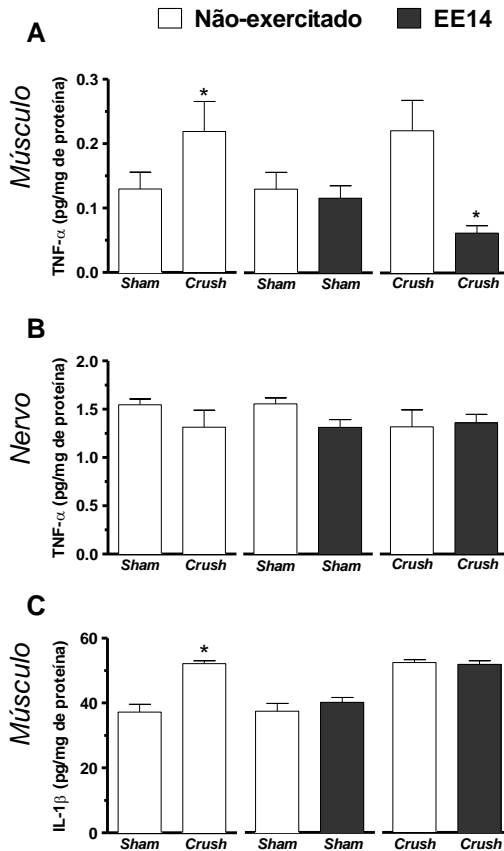
A dosagem de TNF- α revelou que ao 14^o dia pós-operatório a lesão nervosa por esmagamento induziu aumento de $41 \pm 12\%$ ($p < 0,05$) na concentração desta citocina pró-inflamatória no tríceps sural ipsilateral à lesão (Fig. 31A). Quando verificado sua concentração no grupo operado e exercitado foi observada uma redução significativa de

$72 \pm 5\%$ ($p < 0,05$) na concentração de TNF- α na mesma musculatura quando comparado ao grupo operado. Já entre grupos *Sham* não foi verificada diferença alguma na concentração desta citocina.

Nos nervos dos animais pertencentes aos grupos *Sham* ou operados a dosagem de TNF- α e também de IL-1 β não indicaram diferenças significativas entre estes grupos na concentração destas citocinas pró-inflamatórias (Fig. 31B e D).

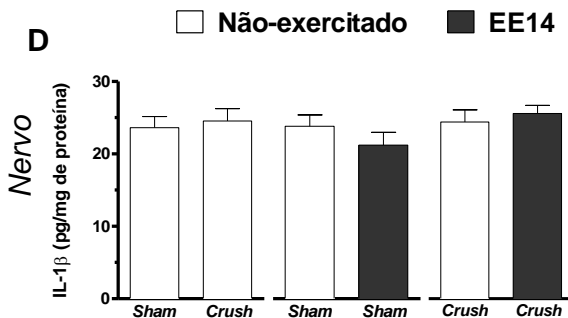
Considerando a concentração de IL-1 β no tríceps sural dos animais (Fig. 31C), a única diferença significativa encontrada foi entre o grupo *Sham* vs. Grupo operado. Onde a lesão nervosa induziu aumento de aproximadamente $29 \pm 5\%$ ($p < 0,05$) desta citocina em ambos os grupos operados. Entre os grupos *Sham* não houve diferença. Neste experimento as concentrações de IL-1 β no nervo dos animais não foram diferentes perante aos testes estatísticos.

Figura 31 - Níveis de citocinas pró-inflamatórias 14 dias após a lesão nervosa (Continua).



Legenda: Ao término dos 14 dias após a lesão nervosa, a dosagem de TNF- α (A e B) revelou que havia aumento significativo em sua concentração apenas no tríceps sural ipsilateral à lesão dos animais do grupo operado. No entanto, o grupo operado e exercitado apresentou redução significativa na concentração desta citocina. Já a dosagem de IL-1 β (C e D) revelou que havia aumento significativo em sua concentração apenas no tríceps sural ipsilateral à lesão dos animais do grupo operado quando comparado aos animais *Sham*. Não foram encontradas diferenças estatísticas na dosagem de IL-1 β no nervo, mesmo comparando os grupos operados ou/com *Sham*. Dados expressos em média e E.P.M. de 8 animais por grupo e testados com o Teste *t* de Student não-pareado unicaudal (asteriscos indicam diferença significativa entre cada par de colunas, $p < 0,05$).

Figura 31 - Níveis de citocinas pró-inflamatórias 14 dias após a lesão nervosa (Continuação).

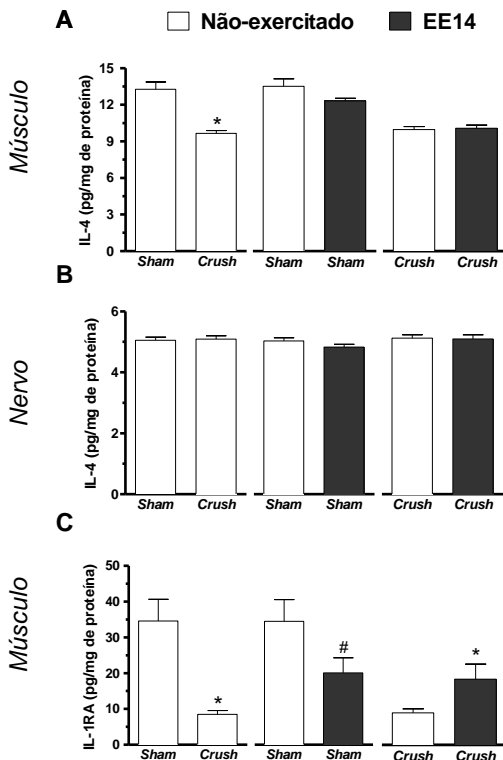


Legenda: Ao término dos 14 dias após a lesão nervosa, a dosagem de TNF- α (A e B) revelou que havia aumento significativo em sua concentração apenas no tríceps sural ipsilateral à lesão dos animais do grupo operado. No entanto, o grupo operado e exercitado apresentou redução significativa na concentração desta citocina. Já a dosagem de IL-1 β (C e D) revelou que havia aumento significativo em sua concentração apenas no tríceps sural ipsilateral à lesão dos animais do grupo operado quando comparado aos animais *Sham*. Não foram encontradas diferenças estatísticas na dosagem de IL-1 β no nervo, mesmo comparando os grupos operados ou/com *Sham*. Dados expressos em média e E.P.M. de 8 animais por grupo e testados com o Teste *t* de *Student* não-pareado unicaudal (asteriscos indicam diferença significativa entre cada par de colunas, $p < 0,05$).

Em relação às citocinas anti-inflamatórias, as dosagens demonstraram que 14 dias após o esmagamento do nervo isquiático tanto a IL-4 (Fig. 32A) quanto a IL-1Ra (Fig. 32C), apresentam-se em menores concentrações no tríceps sural dos animais operados, na ordem de $-27 \pm 2\%$ e $-75 \pm 3\%$ respectivamente ($p < 0,05$). Entretanto, uma semana de exercício excêntrico em esteira foram suficientes para induzir um aumento de $51 \pm 6\%$ ($p < 0,05$) na concentração de IL-1Ra na mesma musculatura dos animais com lesão nervosa, já na concentração de IL-4 nenhum aumento ocorreu (Fig. 32A e 32C).

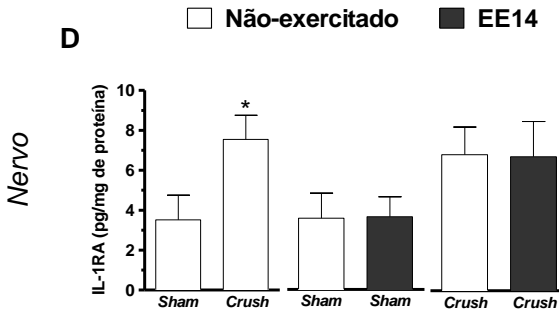
Nos tríceps surais dos animais *Sham*, o EE não induziu mudanças nas concentrações de IL-4 (Fig. 32A), mas na dosagem de IL-1Ra (Fig. 32C), ocorreu redução de $42 \pm 12\%$ ($p < 0,05$) na musculatura após a última sessão de EE.

Quando verificado as concentrações destas citocinas anti-inflamatórias no nervo dos animais dos grupos *Sham* e operados, observou-se que não ocorreu diferença na concentração de IL-4 (Fig. 32B). Contudo, a concentração de IL-1Ra aumentou significativamente [$53 \pm 16\%$ ($p < 0,05$)] no grupo operado quando comparado com o grupo *Sham*, sendo que o EE não restabeleceu este aumento (Fig. 32D).



Legenda: Quanto a IL-4 foi observado diminuição em sua concentração no músculo dos animais dos grupos operados. Nos grupos *Sham* não foi observado nenhuma alteração, seja causado pelo procedimento cirúrgico ou pelo exercício excêntrico. Neste ponto, não foram identificadas diferenças entre os grupos na dosagem envolvendo o nervo isquiático. Na dosagem de IL-1Ra foi observado uma significativa redução no tríceps sural dos animais submetidos à lesão. O exercício excêntrico induziu aumento na concentração desta citocina no músculo para estes animais. Já nos grupos *Sham*, os animais exercitados demonstraram redução de IL-1Ra no tríceps sural 24h após a última sessão de exercício excêntrico. No nervo isquiático foi detectado aumento significativo para os animais submetidos à lesão nervosa. Dados expressos em média e E.P.M. de 8 animais por grupo e testados com o Teste *t* de *Student* não-pareado unicaudal (asteriscos ou cerquilhas indicam diferença significativa entre cada par de colunas, $p < 0,05$).

Figura 32 - Níveis de citocinas anti-inflamatórias 14 dias após a lesão nervosa (Continuação).



Legenda: Quanto a IL-4 foi observado diminuição em sua concentração no músculo dos animais dos grupos operados. Nos grupos *Sham* não foi observado nenhuma alteração, seja causado pelo procedimento cirúrgico ou pelo exercício excêntrico. Neste ponto, não foram identificadas diferenças entre os grupos na dosagem envolvendo o nervo isquiático. Na dosagem de IL-1Ra foi observado uma significativa redução no tríceps sural dos animais submetidos à lesão. O exercício excêntrico induziu aumento na concentração desta citocina no músculo para estes animais. Já nos grupos *Sham*, os animais exercitados demonstraram redução de IL-1Ra no tríceps sural 24h após a última sessão de exercício excêntrico. No nervo isquiático foi detectado aumento significativo para os animais submetidos à lesão nervosa. Dados expressos em média e E.P.M. de 8 animais por grupo e testados com o Teste *t* de *Student* não-pareado unicaudal (asteriscos ou cerquilhas indicam diferença significativa entre cada par de colunas, $p < 0,05$).

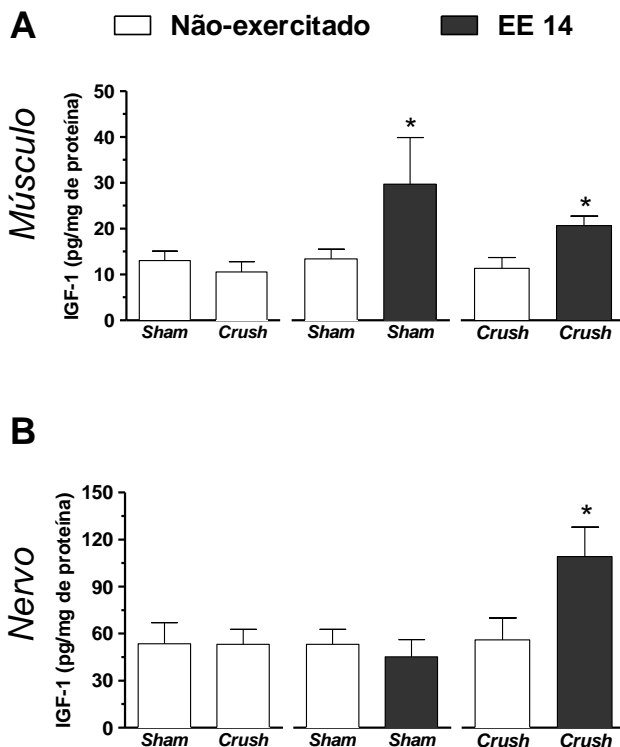
5.7 EFEITO DO EE EM DIFERENTES VELOCIDADES NA CONCENTRAÇÃO DE IGF-1

Nesta etapa, foi verificado a concentração de IGF-1 no músculo e no nervo dos animais submetidos ou não ao EE em esteira rolante (Fig. 33). O grupo *Sham* e exercitado demonstrou aumento significativo nas concentrações de IGF-1 no tríceps sural direito comparado ao grupo *Sham* (Fig. 33A) e não exercitado (aumento de $55 \pm 7\%$, $p < 0,05$). Nos grupos operados (Fig. 33A) foi observado um comportamento semelhante nestas concentrações, onde verificou-se que o grupo operado e exercitado ocorreu aumento da concentração deste fator de crescimento ($45 \pm 11\%$ a mais, $p < 0,05$).

Já a dosagem realizada nos nervos isquiáticos direitos destes animais, os grupos *Sham* não teve diferença entre si para os níveis de IGF-1 (Fig. 33B). Entretanto, foi verificado no grupo operado e exercitado um aumento da concentração em $40 \pm 14\%$ ($p < 0,05$) deste

fator de crescimento em relação ao grupo operado e não exercitado (Fig. 33B).

Figura 33 - Exercício excêntrico aumenta a concentração de IGF-1.



Legenda: Duas semanas após o esmagamento do nervo isquiático e cinco sessões de EE em esteira, durante este período foi observado aumento da concentração de IGF-1 tanto no músculo quanto no nervo dos animais operados e exercitados. No grupo *Sham* e exercitado este aumento limitou-se ao tecido muscular. Neste ponto do experimento não foi detectado um aumento *per se* dos níveis de IGF-1 causado pela lesão nervosa. Dados expressos em média e E.P.M. de 8 animais por grupo e testados com o Teste *t* de *Student* não-pareado unicaudal (asteriscos indicam diferença significativa entre cada par de colunas, $p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, os principais achados demonstram que o treinamento de EE em esteira pode produzir efeito analgésico, bem como acelerar o processo de regeneração do nervo e restaurar a hipotrofia induzida pela desnervação temporária provocada pela lesão por esmagamento do nervo isquiático em camundongos. Dentre os resultados obtidos com o EE destacam-se a redução transiente da hiperalgesia mecânica e supressão da hiperalgesia ao frio, a aceleração da recuperação motora observada através dos índices funcionais que envolvem o desempenho motor e trofismo muscular. Tais repercussões parecem ser dependentes da liberação de fatores de crescimento, como o IGF-1, que aumentou no nervo isquiático e no tríceps sural nos animais que realizaram sessões de EE. Salientamos que até o momento, não há dados na literatura demonstrando que o EE é capaz de reduzir a hiperalgesia num modelo de neuropatia periférica como demonstrado no presente trabalho.

De fato, existem dados na literatura científica que demonstraram que diversos tipos de tratamentos são efetivos na redução da hiperalgesia presente nos modelos de dor que envolvem roedores. Entre estes, destacamos a utilização de fármacos, possíveis fitoterápicos e também por terapias físicas, como exemplo o exercício físico, e todos estes adaptados às condições pré-clínicas (BOBINSKI, 2011; MAZZARDO-MARTINS, 2012; NUCCI, 2012).

Bobinski e colaboradores (2011) já haviam demonstrado que o exercício de baixa intensidade em esteira promove reduções significativas da hiperalgesia (mecânica e ao frio) em camundongos. No entanto, as sessões de exercício foram conduzidas de forma convencional, ou seja, sem nenhum tipo de inclinação ou declínio na esteira. Assim, mediante tais observações, e de acordo com dados da literatura surge a necessidade de ampliar essa abordagem e assim testar se outra forma de exercício de baixa intensidade, mas com maior tensão aos componentes estruturais musculares pode promover efeito anti-hiperalgésico (ENOKA, 1996; ISNER-HOROBETI, 2013; HYLDAHL; HUBAL, 2014).

Logo após as sessões de EE, verificaram-se reduções significativas na hiperalgesia observada nos animais tanto para estímulos mecânicos quanto ao frio. Se os mecanismos de redução da hiperalgesia causados pelo EE em esteira e corrida em nível plano são os mesmos, ainda necessita-se de mais estudos para comprovação. Mas até que se mostre algo diferente, alguns mecanismos relacionados à redução da hiperalgesia causada por exercício físico já foram elucidados

(GEBHART, 2004; DISHMANN; O'CONNOR et al., 2009; MOFFAT; RAE, 2010; MAZZARDO-MARTINS et al., 2010; SZABADI, 2012; PERTOVAARA, 2013; RAICHLLEN et al., 2013).

A ativação de neurônios localizados na Substância Cinzenta Periaquedutal (SCPA) e posteriormente neurônios serotoninérgicos descendentes do núcleo magno da rafe no bulbo (GEBHART, 2004) podem reduzir a ativação das aferências nociceptivas no corno posterior da medula espinal (MOFFAT; RAE, 2010), sendo que estas estruturas podem ser estimuladas por atividade locomotora em animais (GERIN, 2008). Deste modo, pode-se sugerir que a inibição da hiperalgesia observada no presente estudo é dependente da participação de opióides e monoaminas. Contudo, evidências em humanos sugerem que aumentos significativos de endocanabinóides ocorrem de maneira independente da intensidade, onde o exercício moderado (aproximadamente 70% da frequência cardíaca máxima) seria o ponto mais sensível (RAICHLLEN et al., 2013; STEEDS, 2013). No presente estudo foi demonstrado que o EE manteve-se dentro de uma demanda fisiológica leve quando comparado com o exercício realizado em esteira em nível (0°) com a mesma velocidade.

Outro ponto importante observado no presente trabalho foi o fato do EE induzir a liberação de IGF-1, sendo que o aumento da sua concentração foi verificado tanto no tríceps sural quanto no nervo isquiático dos animais exercitados. Este fator de crescimento ativa uma cascata intracelular de cinases, onde resulta na ativação da proteína cinase B/Akt. Interessantemente a enzima GSK-3 β é *downstream* e inibida pela Akt. Essa inibição tem sido estudada inclusive em sítios espinais, pois a atividade desta enzima está envolvida no processo de hiperalgesia e tolerância ao tratamento com morfina, assim seletivamente inibição de sua atividade parece promover efeito anti-hiperalgésico em modelos animais de dor neuropática (PARKITNA, 2006; HEEMST, 2010; EMAMIAN, 2012; MAZZARDO-MARTINS, 2012).

Cabe ressaltar que o IGF-1 não é produzido apenas no tecido muscular e nervoso, este também pode ser produzido e liberado sistemicamente pelo fígado. Assim, possivelmente o IGF-1 poderia chegar à medula espinal por meio da corrente sanguínea e inibir a atividade de enzimas GSK-3 β localmente (NINDL; PIERCE, 2010).

Um fato curioso observado durante o estudo foi o efeito anti-hiperalgésico causado pelas sessões de EE, cujos foram de 24h apenas na hiperalgesia térmica ao frio. Isto significa que após o 15° dia PO, o

efeito anti-hiperalgésico do EE durou 24h. Tal comportamento não foi observado na hiperalgesia mecânica, onde o efeito do EE perdurou no máximo por três horas e ainda foi dependente da velocidade.

Nossos achados sobre este efeito de 24h do EE são parcialmente semelhantes aos de Bobinski e colaboradores (2011), no qual foi verificado que um protocolo de exercício de baixa intensidade induz redução da hiperalgesia ao frio, mas também da hiperalgesia mecânica. Isto talvez indique uma redução da sensibilização central, redução do evento de desinibição, diminuição da atividade de neurônios que expressam a PKC γ , inibição de brotamento e participação de fibras A β na hiperalgesia frente ao estímulo mecânico (BASBAUM et al., 2009; STEEDS, 2013).

Uma explicação para a redução apenas da hiperalgesia ao frio induzida pelo EE poderia estar relacionada a sítios periféricos do sistema nervoso, mais especificamente no gânglio sensorial do nervo espinal. Em um modelo de lesão nervosa por ligadura de raiz nervosa foi observado um aumento significativo na expressão de receptores TRPA1, que também estão relacionados à hiperalgesia ao frio. Essa expressão é dependente primariamente de NGF e ativação da via p38/MAPK. No entanto, o bloqueio da expressão de NGF e/ou da atividade desta via causa diminuições na hiperalgesia ao frio (OBATA et al., 2005).

A redução da atividade destes receptores não pode ser descartada, seja mediada pela redução de NGF *per se* decorrente da própria regeneração do tecido nervoso e muscular antes lesionados, ou por outros fatores induzidos pelo treinamento de EE que também ainda precisam ser elucidados (RAIVICH et al., 1990).

A hiperalgesia ao frio também parece ser modulada por sítios supra espinais como a substância cinzenta periaquedutal. Os neurônios da substância cinzenta periaquedutal possuem projeções descendentes a núcleos serotoninérgicos da rafe no tronco encefálico (como o núcleo magno da rafe), onde na maioria das vezes formam sinapses excitatórias com tais núcleos. Quando ativados os neurônios serotoninérgicos, que projetam-se por sua vez, ao corno posterior da medula espinal têm papel inibitório principalmente sobre fibras A δ e C que são fibras condutoras de estímulos sensoriais de temperatura. Essa via parece ser ativada pelo aumento da locomoção em mamíferos (DUGAN; MORTON, 1983; JACOBS; MARTÍN-CORA; FORNAL, 2002; GEBHART, 2004; GERIN, 2008).

O grande paradoxo entre o processo de regeneração nervosa periférica e o exercício físico é a dor neuropática que acompanha este processo. Isto desafia a compreensão no todo de como podemos

maximizar a regeneração nervosa e reduzir os sintomas neuropáticos, pois, há a necessidade de neurotrofinas na regeneração que ao mesmo tempo contribuem para sensibilização central. Um dos eventos decorrente da lesão de nervos é a ativação microglial e consequente aumento de neurotrofinas, como o próprio fator de crescimento derivado do encéfalo (BDNF) (COBIANCHI et al., 2010; GANGADHARAN; KUNER, 2013).

Esta neurotrofina aumenta a excitabilidade neuronal por inativar canais cotransportadores de potássio e cloreto (KCC2) pós-sinápticos via seu receptor TRKB. Isto diminui a atividade inibitória dos receptores GABA-A no fenômeno de desinibição pela quebra no gradiente de Cl^- . No entanto, o BDNF induzido por exercício físico parece reduzir a expressão de sinapsina-I (proteína de vesícula sináptica) e assim também pode reduzir a atividade sináptica no corno posterior da medula espinal (HUTCHINSON et al., 2004; GANGADHARAN; KUNER, 2013).

O próprio IGF-1 parece ter um papel dual em modelos de dor. Ademais quando foi antagonizado (bloqueado) o receptor do IGF-1 ocorreu o bloqueio (fechamento) de canais de Ca^{2+} do tipo T no gânglio sensorial do nervo espinal e, consequente, redução significativa da hiperalgesia por até duas horas em um modelo de dor inflamatória. Além disto, o IGF-1 causou diminuição do limiar sensorial compatível com a hiperalgesia ao ser administrado na pata de roedores (ZHANG et al. 2014). Apesar de induzir hiperalgesia no sistema nervoso periférico, o mesmo não se pode afirmar para o sistema nervoso central, uma vez que a sinalização do IGF-1 na medula espinal induz aumento do limiar sensorial (BITAR et al., 1996; BITAR; PILCHER, 1998). Tal fato poderia explicar os achados de redução da hiperalgesia promovida pelo EE no presente estudo ser misto, ou seja, reduz a hiperalgesia ao frio em longo prazo *vs.* redução da hiperalgesia mecânica em curto prazo. De fato, foi verificado que a concentração de IGF-1 do grupo exercitado a 14 m/min estava consideravelmente maior no músculo e no nervo ipsilateral à lesão nervosa.

A redução da hiperalgesia observada neste estudo também pode ser resultante do aumento na concentração de IGF-1 circulante de origem hepática, o qual chega até a medula espinal. Estudos já demonstraram que injeções intratecais de IGF-1 induzem aumento no limiar sensorial de ratos saudáveis de ambos os sexos e em ratos diabéticos (estes possuem redução na expressão de IGF-1 e IGF-1R). Por outro lado, tem sido demonstrado que a inibição de aferência

nociceptiva pode envolver a participação de receptores adrenérgicos- α_2 , neste caso, parece que estes receptores não participam no efeito mediado pelo IGF-1 (BITAR et al., 1996; BITAR; PILCHER, 1998). Assim, estudos adicionais são necessários para efetivamente esclarecer o verdadeiro papel no controle da dor decorrente do aumento da concentração de IGF-1 no gânglio sensorial do nervo espinal ou na medula espinal, bem como verificar se a atividade do IGF-1 tende ao efeito anti- ou pró-hiperalgésico.

No presente estudo foi observado que a concentração de IGF-1 ao 14º dia PO estava elevada no músculo dos animais exercitados a 14 m/min e no nervo apenas do grupo operado e exercitado. Estas evidências demonstram que o protocolo de EE induziu um aumento na produção de IGF-1 em ambas as condições, no músculo saudável ou em processo de desnervação/reinervação. Dados da literatura sugerem que é provável que este aumento de IGF-1 observado seja decorrente de síntese local e que sua ação seja principalmente autócrina/parácrina. No entanto não se podem descartar os efeitos sistêmicos decorrente do IGF-1 de origem hepática, embora haja dados conflitantes na literatura demonstrando redução, aumento ou nenhuma alteração na concentração de IGF-1 na circulação mesmo após o estímulo por hormônio do crescimento (VELLOSO, 2008; FRYSTYK, 2010).

Por outro lado, foi avaliado também o peso do tríceps sural de animais operados e exercitados a 14 m/min, onde pôde-se observar que no 14º dia PO, apesar da hipotrofia (perda de massa) decorrente da lesão nervosa (Fig. 26) ocorreu um aumento significativo no peso do tríceps sural direito e esquerdo (Fig. 27). Isto presumivelmente ocorreu devido a uma compensação de movimentos no membro (íntegro) contralateral (Fig. 24) no período inicial do experimento, ou seja, logo após a lesão nervosa e pelo menos 10 dias após este evento. O resultado foi uma sobrecarga maior no lado esquerdo e assim o aumento do peso do tríceps sural no lado esquerdo.

Se inicialmente o membro do lado lesionado tem pouca atividade voluntária e isto prejudica o desempenho funcional, pelo menos até o 10º dia PO (Fig. 24), o fato de o peso do tríceps sural direito ao 14º dia PO do grupo operado e exercitado a 14 m/min ter recuperado parcialmente, mas significativamente (quando comparado ao não exercitado) o peso muscular (Fig. 27), pode ser decorrente de fatores de crescimento circulantes, como GH e IGF-1, induzido pelas ações excêntricas dos outros membros dos animais (BAMMAN et al., 2001; NINDL; PIERCE, 2010; CALIXTO et al., 2014).

Algumas células como fibroblastos, células endoteliais e musculares respondem a sinais mecânicos. O estresse mecânico promove a expressão gênica de alguns fatores de crescimento, onde destaca-se a isoforma de IGF-1 (MGF) no músculo esquelético com funções autócrinas e parácrinas (DAI et al, 2010). Desta forma, sabendo que o IGF-1 induzido por tensão mecânica (MGF) nos componentes estruturais do músculo precisa de ações musculares para sua síntese (NINDL; PIERCE, 2010), os músculos comprometidos por lesão ou desnervação não poderiam sintetizá-lo em concentrações que resultem em ganho ou recuperação do peso no próprio músculo (SHAVLAKADZE et al., 2005).

Isto se justifica pelo estudo de Pu e colaboradores (1999), que verificou aumento na concentração do gene de IGF no músculo sóleo após lesão por esmagamento do nervo isquiático. Este aumento permaneceu elevado do 2º dia PO e pelo menos até o 40º dia PO, mas ao mesmo tempo, foram acompanhados por perda progressiva de massa magra. Todavia, no presente estudo demonstrou-se que a lesão por esmagamento reduziu significativamente o peso muscular no tríceps sural e força de preensão (Fig. 25 e 26), sendo que o EE foi importante para restabelecer o peso muscular no tríceps sural e força de preensão (Fig. 25 e 26). Tal efeito denota a grande mobilização e/ou síntese de fatores de crescimento decorrente destas ações musculares excêntricas (BAMMAN et al., 2001; CALIXTO et al., 2014). Assim, no presente estudo foi observado aumento na concentração de IGF-1 por um protocolo de EE em esteira, sendo que até o momento estes achados são inéditos na literatura e aqui demonstramos em dois paradigmas diferentes (músculo saudável e músculo em desnervação + neuropatia periférica).

Surpreendentemente, a lesão nervosa reduziu o peso do tríceps sural direito nove semanas após o esmagamento (Fig. 27 C) e os animais com lesão, mas submetidos ao EE apresentaram maior peso muscular quando comparados com os animais não-exercitado. Assim, o EE promoveu maior (acelerado) ganho de massa muscular após a lesão nervosa. Isto demonstra o potencial deste protocolo no ganho de massa magra e hipertrofia conforme mostrado na literatura como uma das principais características decorrentes das ações excêntricas (LASTAYO et al., 2010; ISNER-HOROBETI et al., 2013; TSUMIYAMA et al., 2014b).

A esse respeito não se pode deixar de salientar novamente que estas adaptações musculares são decorrentes primeiramente do processo

de desnervação e reinervação após a lesão por esmagamento do nervo isquiático. E posteriormente, conforme o treinamento foi realizado, fatores de crescimento como o BDNF e IGF-1 (Fig. 30A), geralmente em maior concentração, podem atuar para promover regeneração muscular, nervosa com consequente ganho de peso muscular (GLAZNE; MORRISON; ISHII, 1994; SHAVLAKADZE et al., 2005; DAI et al., 2010; BONGERS et al., 2013; ENGLISH; WILHELM; WARD, 2014).

Sobre a força de preensão da pata (Fig. 25A) verificou-se que houve recuperação acelerada coincidindo com o período observado nos índices do isquiático (entre o 14º e 15º dia PO) para os animais treinados nas velocidades de 10 e 14 m/min. Apesar de exercícios que envolvam contrações excêntricas geralmente causarem dor muscular tardia e consequentemente redução temporária de força (ARMSTRONG; OGILVIE; SCHWANE, 1983; HYLDAHL; HUBAL, 2014), no protocolo estudado, estes comportamentos não foram exacerbados em nenhum momento no experimento. O gráfico de força preensão da pata posterior esquerda (Fig. 25B) permite tal afirmação, pois a força neste lado (não afetado em termos motores e sensoriais) permaneceu constante e sem diferenças entre os grupos durante todo o experimento. Assim, mesmo que inicialmente o lado direito com déficit motor decorrente da lesão nervosa impusesse a sobrecarga para o lado esquerdo (Fig. 27B), as contrações excêntricas não induziram perda na força de preensão neste membro.

Semelhante ao comportamento observado no peso muscular, quando comparou-se a força basal vs. a força após nove semanas de experimento (Fig. 25C e D), apenas o grupo *Sham* e os grupos operados e exercitados nas maiores velocidades obtiveram diferença significativa. Então, apesar do crescimento dos animais promoverem efeito *per se* no aumento de força (*Sham*), o esmagamento do nervo causou um déficit crônico na força dos grupos operado e não exercitado/EE6, que foi revertido pelo EE em maiores velocidades.

Neste contexto, um interessante estudo realizado com idosos sobreviventes de câncer conduzido por Lastayo e colaboradores (2010), demonstrou que um programa crônico de exercícios de membro inferior baseado apenas em contrações excêntricas promoveu aumento significativo na força e nenhum aumento significativo na percepção de dor na coxa em todo o experimento. Desta forma, estes protocolos EE parecem ser uma abordagem interessante e segura para indivíduos com comprometimento da capacidade física, baixa mobilidade e hipotrofia. Se há diferenças na força de preensão durante a regeneração nervosa

entre o treinamento em esteira em nível (0°) e o treinamento em esteira excêntrica (-16°) não se pode afirmar com precisão. Entretanto, a curva de recuperação é semelhante para os grupos tratados com exercício físico (BOBINSKI et al., 2011).

A recuperação motora avaliada pelos índices do isquiático (Fig. 24) demonstrou que diferente da força de preensão, os animais operados e exercitados reestabeleceram a função motora mais rapidamente que os animais operados e não-exercitados. Este padrão de resposta da recuperação motora foi semelhante ao encontrado por Bobinski e colaboradores (2011), em que os animais exercitados após a lesão nervosa obtiveram recuperação mais acelerada do que animais que não realizaram o protocolo de exercício em esteira de baixa intensidade.

Entretanto, são controversos aos achados de Cobianchi e colaboradores (2010) que demonstraram que apenas o exercício durante a primeira semana após a lesão nervosa causou alguma recuperação motora acelerada. O grupo exercitado por oito semanas não demonstrou o mesmo comportamento. Porém, neste estudo o modelo de lesão nervosa adotado foi a contração crônica do nervo isquiático, o que difere do modelo de esmagamento do nervo por ser uma lesão crônica e não apenas um evento lesivo. Outra diferença é a inclinação da esteira, que era ajustada em 0° , o tempo da sessão de treino (uma hora) e a velocidade que era incremental dentro da mesma sessão (12 até 31,2 m/min) elevando a intensidade provavelmente até o domínio severo de exercício físico para os camundongos (BENEKE, 2003; BOBINSKI et al., 2011).

A análise histomorfométrica ao fim da 9ª semana de experimento nos fornece uma noção direta do estado regenerativo no nervo isquiático. Os resultados demonstram que além de a cirurgia induzir alterações morfológicas no nervo dos animais o EE influenciou diretamente a dinâmica da regeneração nervosa, pois podemos observar que a densidade de fibras mielinizadas e a área de tecido mielinizado estavam reduzidas no máximo em $11 \pm 7\%$ e $41 \pm 7\%$, respectivamente, nos animais treinados. No entanto, os animais apenas operados observase uma redução de $33 \pm 6\%$ e $56 \pm 3\%$ para os mesmos quesitos ao fim das nove semanas de experimento.

Numa correlação entre estes dados e os dados de recuperação sensorio-motora apresentados posteriormente, é interessante ressaltar que mesmo os animais não demonstrarem uma regeneração plena pelo ponto de vista do número de fibras ou área de tecido mielinizado a recuperação aconteceu. Essa baixa correlação sugere que a precisão no

recrescimento até o órgão alvo é mais importante que o número de fibras em recrescimento (DE MEDINACELI, 1995).

As terapias físicas, dentre estas o exercício físico, influenciam positivamente o crescimento axonal após esmagamento do nervo, entretanto as variáveis como o volume, intensidade e quando iniciá-lo parecem modificar o grau da regeneração. A participação de neurotrofinas é indispensável para o processo de crescimento axonal e parece ser a conexão entre o exercício físico e a regeneração nervosa periférica (MARTINS, 2008; MARTINS et al., 2011; UDINA et al., 2011; BOBINSKI et al., 2011).

Como neste estudo verificou-se que a concentração de IGF-1 estava elevada, uma importante neurotrofina que também induz crescimento de neuritos após lesão nervosa (SULLIVAN; KIM; FELDMAN, 2008), é provável que tenha influenciado na velocidade e na precisão da regeneração nervosa. No entanto, é necessário considerar outras neurotrofinas relacionadas ao crescimento, bem como as células não-neuronais responsáveis por eventos neuroinflamatórios e pelo ambiente de suporte ao crescimento durante a regeneração. Assim, futuros experimentos podem elucidar o espectro de ações que o EE pode influenciar durante o processo de regeneração nervosa.

As citocinas têm papéis importantes durante o evento de regeneração nervosa e recuperação funcional. Após a lesão nervosa, células residentes como as de Schwann e do sistema imune expressam IL-1 β , TNF- α e outras quimiocinas que atraem mais células imunes (como neutrófilos e monócitos/macrófagos M1) para o local da lesão (GAUDET; POPOVICH; RAMER, 2011).

Em um estudo realizado por Nadeau e colaboradores (2011) foi demonstrado que animais *knock-out* para a IL-1 β e/ou TNF- α têm a recuperação funcional mais lenta e o limiar sensorial normal após a lesão nervosa. Estes resultados demonstram que estas citocinas interferem provavelmente na fagocitose de detritos celulares promovidas principalmente por macrófagos M1, atraídos ao sítio da lesão. Este fenótipo M1 promove crescimento de neuritos, mas ao mesmo tempo pode ser neurotóxico (GAUDET; POPOVICH; RAMER, 2011).

O presente estudo demonstrou que no 14º dia PO a concentração de citocina IL-1 β e TNF- α estavam semelhante no grupo falso-operado (*Sham*) e experimentais (esmagados) (Fig. 314B e D) no nervo dos animais. Isto é compatível com a informação de que estas citocinas apresentam pico logo após a lesão e estão consideravelmente reduzidas duas semanas após este evento (BOSSE, 2012; VIDAL et al., 2013). Controversamente, o estudo de BOBINSKI e colaboradores (2011), que

utilizou a mesma lesão nervosa e encontrou níveis elevados de IL-1 β e TNF- α no grupo operado e não exercitado duas semanas após a lesão. Talvez um fator importante seja o início do protocolo de exercício físico que no presente estudo se deu ao 7º dia PO.

Outro ponto interessante, em relação a dosagem das citocinas, foi que o protocolo de EE não aumentou a resposta inflamatória, pois, ao 14º dia PO estas citocinas apresentaram concentração semelhante ao grupos *crush*, sugerindo que a fase aguda da degeneração Walleriana relacionada a limpeza de detritos celulares foi concluída e foi sucedida pela fase de reparo essencialmente pela presença de maior concentração de citocinas anti-inflamatórias e macrófagos M2 (DUBOVÝ, 2011; NADEAU et al., 2011; BOSSE, 2012).

Com o início do protocolo de EE na segunda semana é provável que o EE potencializou a ação de mediadores pró-reparo e regeneração presentes neste período. Como a presença de macrófagos M2, IL-6 (que induz expressão de NGF) e os níveis de IGF-1 sintetizado em células de Schwann e macrófagos hematogênicos (Fig. 33B) (GLAZNER; MORRISON; ISHII, 1994; PU; ZHUANG; ISHII, 1995; ZHONG et al., 1999; NADEAU et al., 2011; SAKOWSKI; FELDMAN, 2012; BOSSE, 2012). Apesar d concentração de IL-4 não estar elevado, o que poderia nos inferir a presença de macrófagos M2, a concentração da IL-1Ra permaneceu elevado nos animais operados coincidindo com redução de IL-1 β . O que pode indicar redução e resolução da inflamação. Experimentos futuros com dosagens de marcadores indiretos como IL-10 e IL-12 poderiam esclarecer este perfil (MOSSER; EDWARDS, 2008). Na lesão nervosa a IL-10, que é anti-inflamatória, modula a resposta de células imunes, aumenta a sobrevivência e a regeneração axonal (VIDAL et al., 2013).

Em relação ao IGF-1 no nervo, os dados do presente estudo vão ao encontro de resultados apresentados na literatura demonstrando aumento da expressão genica após o esmagamento do nervo isquiático em ratos (GLAZNER; MORRISON; ISHII, 1994). Este aumento *per se* após a lesão parece ter pico na primeira semana e reduz drasticamente na segunda, que neste estudo permaneceu elevado provavelmente em função da aplicação do EE (Fig. 33).

O IGF-1 tem sido relacionado a reduções da neuropatia diabética e aumento na regeneração nervosa. Estes efeitos se dão provavelmente pelos receptores no tecido nervoso e nas próprias células de Schwann. Embora seja controverso a sua atividade em relação à hiperalgesia por experimentos *in vivo* e *in vitro* demonstrarem atividade anti-

hiperalgésica na medula espinal e pró-hiperalgésica no nervo espinal (BITAR et al., 1996; BITAR; PILCHER, 1998; ZHANG et al., 2014). De uma forma geral os resultados deste estudo apontam na direção de redução da hiperalgesia induzida pela lesão nervosa. No entanto, se o EE realmente atua promovendo síntese ou aporte de IGF-1 nos sítios medulares ainda não podemos afirmar.

Quando observamos pelo ponto de vista da desnervação e indução de perda de peso do músculo (Fig. 26) induzida pela lesão nervosa, podemos afirmar que o IGF-1 em maior concentração no músculo dos animais submetidos ao EE pode ser um indicador positivo na recuperação da massa magra e até hipertrofia. Afinal, a aplicação exógena de IGF-1 reduz a hipotrofia causada em modelos de desnervação crônica (DAY et al., 2002; SHAVLAKADZE et al., 2005).

Durante a desnervação o estado catabólico de miofibrilas e citoesqueleto está em alta atividade, onde os eventos mais proeminentes são a ativação da degradação proteica pelo sistema ubiquitina-proteassoma e a autofagia celular. As citocinas pró-inflamatórias contribuem diretamente para este estado pela ativação de seus receptores e de fator nuclear kappa B (NF- κ B), um complexo protéico regulador de transcrição de genes relacionados à hipotrofia muscular (COHEN; NATHAN; GOLDBERG, 2014). No presente estudo a dosagem de TNF- α (Fig. 31A) revelou que ao 14º dia PO havia uma concentração elevada no grupo operado e não exercitado. No grupo operado e submetido ao EE foi observado uma concentração significativamente menor, somado ao fato de maior concentração de IGF-1 (Fig. 33A). Isto provavelmente refletiu o ganho de peso muscular observado neste grupo em relação ao não exercitado (Fig. 27A).

No entanto, a dosagem de citocinas ainda demonstrou que havia atividade inflamatória no tecido muscular, pois os níveis de IL-1 β ainda estavam elevados (Fig. 31C). Apesar disso, para o grupo operado e exercitado provavelmente já havia um balanço positivo entre fatores tróficos/sobrevivência e fatores hipotróficos, possibilitando ganho de peso muscular no experimento agudo, e posteriormente com as repetidas sessões, no crônico (Fig. 27C).

A lesão nervosa também induziu redução da expressão do IL-1Ra e IL-4 no tríceps sural direito (Fig. 32), mas com apenas uma semana de EE já ocorreu reversão parcial na concentração de IL-1Ra.

Três resultados chamaram a atenção ao demonstrar que as sessões de EE promoveram adaptações do ponto de vista muscular: i) a concentração de IGF-1 foi maior nos animais exercitados (Fig. 33A); ii) a concentração reduzida de TNF- α no grupo operado e exercitado (Fig.

31A), mas não em animais *Sham* e exercitados; iii) o protocolo de EE reduziu a concentração de IL-1Ra nos animais *Sham* e exercitados, no entanto, aumentou nos animais operados e exercitados. O motivo destes níveis reduzidos de IL-1Ra observado no EE ocorrer apenas no músculo saudável ainda é uma incógnita, pois, esta citocina tem apenas atividade antagonista no receptor de IL-1 e ainda não teve correlação com os níveis de IL-1 β no músculo que permaneceram normais (Fig. 31C e 32C) (OLIVEIRA et al., 2011).

A velocidade de 14 m/min foi escolhida para este experimento agudo pelo fato de que mesmo sendo a maior da curva de intensidade não causava grande demanda fisiológica de esforço (Fig. 21) observado pela concentração de lactato sanguíneo. Tal achado foi semelhante aos dados já relatados por Tsumiyama e colaboradores (2014a) em um estudo com ratos, onde observaram diferenças significativas na velocidade do limiar de anaeróbio entre a corrida em nível plano (0°) e em *downhill* (excêntrica, -16°) o qual era maior. Perante a medida da concentração de lactato podemos afirmar que o EE em esteira no presente estudo foi executado no domínio de intensidade leve (BENEKE, 2003; BOBINSKI et al., 2011).

Em estudos envolvendo humanos também ocorre o mesmo perfil na concentração de lactato quando comparada a roedores. Se compararmos parâmetros como o próprio lactato, consumo de oxigênio e frequência cardíaca durante um teste em cicloergômetros comuns ou excêntricos, haverá incremento e concomitante aumento destes parâmetros de demanda fisiológica apenas no ergômetro comum, com pequenos ou nenhum incremento no excêntrico (ISNER-HOROBETI et al., 2013).

Já em uma caminhada em esteira a ~4,9 Km/h há um comportamento curvilíneo destes parâmetros. Assim, na esteira em nível e em maiores inclinações, ocorre progressivamente aumento da demanda energética, já o aumento do declínio (*downhill*) diminui esta demanda e é melhor tolerado, para indivíduos jovens e idosos. No entanto, há uma faixa ótima para reduzir a demanda energética, que parece ser entre -5 e -10% de declínio. Para valores maiores de declínio, como -15 e -20%, a dificuldade aumenta bem como a percepção de esforço, a pressão arterial sistólica, frequência cardíaca e o consumo de oxigênio (NAVALTA; SEDLOCK; PARK, 2004).

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, em que os grupos com as maiores velocidades demonstraram uma recuperação motora e sensorial mais acelerada e que estas velocidades ao início do

estudo são consideradas de baixa intensidade (Fig. 21), é provável que indivíduos em quadros algícos consigam tolerá-las. No entanto, visando experimentos clínicos e pré-clínicos futuros, ainda há a necessidade de encontrar e periodizar variáveis como frequência, velocidade, tempo, inclinação ideal e quando iniciar o protocolo de EE. Entretanto, parece ser uma interessante intervenção para populações especiais tais como: idosos, reabilitação cardíaca, quadros algícos, osteoartrite de joelho e de tendinoses (LASTAYO et al., 2003; ISNER-HOROBETI et al., 2013).

7 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou que o EE apresentou um bom potencial terapêutico nas disfunções associadas ao modelo de esmagamento do nervo isquiático. Dentre as quais podemos destacar:

1. O protocolo de EE foi capaz de reduzir a hiperalgesia ao frio em curto e longo prazo, contribuindo para a recuperação sensorial. O efeito sobre a hiperalgesia mecânica foi mais brando, mas as sessões reduziram os sinais por até três horas;
2. O EE acelerou a recuperação motora observado através da força de prensão dos animais, na restauração da marcha e redução da hipotrofia muscular do tríceps sural direito causada pela lesão nervosa. Onde com apenas uma semana reverteu parcialmente a disfunção motora e a hipotrofia muscular;
3. O EE demonstrou potencial benéfico na promoção de regeneração nervosa periférica verificada diretamente pela histomorfometria de cortes transversais do nervo isquiático após oito semanas de treinamento. Os dados de recuperação sensorio-motora fortalecem este efeito;
4. Após uma semana de treinamento foi possível observar aumentos significativos na concentração de IGF-1 no músculo e no nervo dos animais operados. Provavelmente um fator importante envolvido no efeito do EE;
5. Em uma semana, o EE reduziu a concentração de TNF- α e aumentou a concentração de IL-1Ra no músculo dos animais operados e exercitados. No entanto, reduziu a concentração de IL-1Ra em animais *Sham*, indicando uma diferença entre músculos saudáveis e hipotrofiados. Ainda é preciso salientar que perante a dosagem de citocinas pró-inflamatórias ao 14º dia PO o EE não exacerbou tal resposta em nenhum dos grupos experimentais;
6. A maior velocidade de EE utilizada neste trabalho não induz aumento nas concentrações de lactato, diferentemente de quando a esteira estava ajustada sem declínio (0º).

Assim, o presente estudo mostrou que o protocolo de EE promoveu importante efeito analgésico e recuperação sensorial e motora, bem como regeneração nervosa periférica corroborando com a literatura atual. No entanto, entende-se que por ser um trabalho precursor, ainda há lacunas a se esclarecer como os mecanismos

neurobiológicos envolvidos nestes efeitos e a viabilidade na reabilitação de quadros de dor neuropática em humanos. Além disto, pode ser uma boa e nova abordagem para programas de exercício físico voltado a populações com baixa capacidade física associada a dor crônica.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A. S. et al. Mitochondrial IV complex and brain neurotrophic derived factor responses of mice brain cortex after downhill training. **Neuroscience Letters**. v. 426, p. 171-174, 2007.
- AGUIAR, A. S. et al. Intense exercise induces mitochondrial dysfunction in mice brain. **Neurochemical research**, v. 33, n. 1, p. 51-58, jan. 2008a.
- AGUIAR, A. et al. Downhill training upregulates mice hippocampal and striatal brain-derived neurotrophic factor levels. **Journal of Neural Transmission**. v. 115, p. 1251–1255, jul. 2008b.
- ALLODI, I.; UDINA, E.; NAVARRO, X. Specificity of peripheral nerve regeneration: Interactions at the axon level. **Progress in Neurobiology**. v. 98, n. 1, p. 16-37, jul. 2012.
- ARMADA-DA-SILVA, P. A. et al. Role of physical exercise for improving posttraumatic nerve regeneration. **International Review of Neurobiology**. v. 109, p. 125-149, 2013.
- ARMAND, A. -S. et al. Effects of eccentric treadmill running on mouse soleus: degeneration/regeneration studied with Myf-5 and MyoD probes. **Acta Physiologica Scandinavica**. v. 179, p. 75-84, 2003.
- ARMSTRONG, R. B., OGILVIE, R. W., SCHWANE, J. A. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**. v. 54, p. 80-93, 1983.
- BAMMAN, M. M. et al. Mechanical load increases muscle IGF-I and androgen receptor mRNA concentrations in humans. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**. v. 280, n. 3, mar. 2001.
- BANNISTER, J. V.; CALABRESE, L. Assays for superoxide dismutase. **Methods of Biochemical Analysis**. v. 32, p. 279–312, 1987.
- BAPTISTA A. F. et al. 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. 259-64, abr. 2007.

BARASH, I. A. et al. Desmin cytoskeletal modifications after a bout of eccentric exercise in the rat. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.** v. 283, n. 4, p. R958-963, out. 2002.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell.** v. 139, p. 267-284, out. 2009.

BENEKE, R. Methodological aspects of maximal lactate steady state-implications for performance testing. **European Journal of Applied Physiology.** v. 89, n. 1., p. 95-99, mar. 2003.

BERTHIER, C.; BLAINEAU, S. Supramolecular organization of the subsarcolemmal cytoskeleton of adult skeletal muscle fibers. a review. **Biology of The Cell.** v. 89, n. 7, out. 1997.

BITAR, M. S. et al. Antinociceptive action of intrathecally administered IGF-I and the expression of its receptor in rat spinal cord. **Brain Research.** v. 737, p. 292-294, 1996.

BITAR, M. S.; PILCHER, C. W. T. Attenuation of IGF-1 antinociceptive action and a reduction in spinal cord gene expression of its receptor in experimental diabetes. **Pain.** v. 75, p. 69-74, 1998.

BLAIR, S. N. et al. Physical activity and all-cause mortality: a prospective study of health men and woman. **The Journal of the American Medical Association.** v. 262, n. 17, p. 2305-2401, 1989.

BOBINSKI, F. et al. Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. **Neuroscience.** v. 194, p. 337-348, 2011.

BOLDRIN, L.; MUNTONI, F.; MORGAN J. E. Are human and mouse satellite cells really the same. **Journal of Histochemistry & Citochemistry.** v. 58, n. 11, p. 941-955, 2010.

BONGERS, K. S. et al. Skeletal muscle denervation causes skeletal muscle atrophy through a pathway that involves both Gadd45a and

HDAC4. **The American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**. v. 305, n. 1, p. E907-E915, out. 2013.

BOOTH, F. W.; ROBERTS, C. K.; LAYE, M. J. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. **Comprehensive Physiology**. v. 2, n. 2, p. 1143-1211, abr. 2012.

BORTALANZA, L. B. et al. Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. **European Journal of Pharmacology**. v. 453, n. 2-3, p. 203-208, out. 2002.

BOSSE, F. Extrinsic cellular and molecular mediators of peripheral axonal regeneration. **Cell and Tissue Research**. v. 349, n. 1, p. 5-14, jul. 2012.

CALIXTO, R. D. et al. Acute effects of movement velocity on blood lactate and growth hormone responses after eccentric bench press exercise in resistance-trained men. **Biology of Sport / Institute of Sport**. v. 31, n. 4, p. 289-294, dez. 2014.

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

CIDRAL-FILHO, F. J. et al. Light-emitting diode therapy induces analgesia and decreases spinal cord and sciatic nerve tumour necrosis factor- α levels after sciatic nerve crush in mice. **European Journal of Pain**. v. 17, n. 8, p. 1193-1204, set. 2013.

CHO, J. et al. Treadmill running reverses cognitive declines due to Alzheimer's disease. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. jan. 2015.

CHOI, Y. et al. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. **Pain**. v. 59, n. 3, p. 369-376, dez. 1994.

COBIANCHI, S. et al. Short- but not long-lasting treadmill running reduces allodynia and improves functional recovery after peripheral nerve injury. **Neuroscience**. v. 168, n. 1, p. 273-287, jun. 2010.

COHEN, S.; NATHAN, J. A.; GOLDBERG, A. L. Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies. **Nature Reviews. Drug Discovery**. v. 14, n. 1, p. 58-74, dez. 2014.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neurophatic pain: a maladaptative response of the nervous system to damage. **Annual Review of Neuroscience**. v. 32, p. 1-32, 2009.

DAENEN, L. et al. Exercise, not to exercise, or how to exercise in patients with chronic pain? applying science to practice. **The Clinical Journal of Pain**. v. 31, n. 2, p. 108-114, fev. 2015.

DAI, Z. et al. IGF-1Ec expression, regulation and biological functions in different tissues. **Growth Hormone & IGF Research**. v. 20, n. 4, ago. 2010.

DAY, C. S. et al. Insulin growth factor-1 decreases muscle atrophy following denervation. **Microsurgery**. v. 22, n. 4, p. 144-151, 2002.

DE MEDINACELI, L. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 58, n. 1-2, p. 29-37, mai. 1995.

DISHMANN, R. K.; O'CONNOR, P. J. Lessons in exercise neurobiology: The case of endorphins. **Mental Health and Physical Activity**. v. 2, p. 4-9, 2009.

DUAN, C.; REN, H.; GAO S. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: roles in skeletal muscle growth and differentiation. **General and Comparative Endocrinology**. v. 167, p. 344-351, 2010.

DUBOVÝ, P. Wallerian degeneration and peripheral nerve conditions for both axonal regeneration and neuropathic pain induction. **Annals of Anatomy**. v. 193, n. 4, p. 267-175, jul. 2011.

DUGGAN, A. W.; MORTON, C. R. Periaqueductal grey stimulation: an association between selective inhibition of dorsal horn neurones and changes in peripheral circulation. **Pain**. v. 15, n. 3, p. 237-248, mar. 1983.

DWORKIN, R. H. et al. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. **Archives in Neurology**. v. 60, n. 11, p. 1524-1534, 2003.

EBERT, S. M. et al. Stress-induced skeletal muscle Gadd45a expression reprograms myonuclei and causes muscle atrophy. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 287, n. 33, p. 27290-27301, ago. 2012.

EMAMIAN, E. S. Akt/GSK3 signaling pathway and schizophrenia. **Frontiers in Molecular Neuroscience**. v. 5, n. 33, mar. 2012.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**. v. 186, p. 407-421, 1990.

ENGLISH, A. W.; WILHELM, J. C.; SABATIER, M. J. Enhancing recovery from peripheral nerve injury using treadmill training. **Annals of Anatomy**. v. 193, p. 354-361, 2011.

ENGLISH, A. W.; WILHELM, J. C.; WARD, P. J. Exercise, neurotrophins, and axon regeneration in the PNS. **Physiology**. v. 29, n. 6, p. 437-445, nov. 2014.

ENOKA, R. M. Eccentric contractions require unique activation strategies by the nervous system. **The Journal of Applied Physiology**. v. 81, p. 2339-2346, 1996.

FLITNEY, F. W.; HIRST, D. G. Cross-bridge detachment and sarcomere 'give' during stretch of active frog's muscle. **The Journal of Physiology**. v. 276, mar. 1978.

FRYSTYK, J. Exercise and the growth hormone-insulin-like growth factor axis. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. v. 42, n. 1, p. 58-66, jan. 2010.

FU, S. Y.; GORDON, T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. **Molecular Neurobiology**. v. 14, n. 1-2, p. 67-116, fev.-abr. 1997.

GANGADHARAN, V.; KUNER, R. Pain hypersensitivity mechanisms at a glance. **Disease Models & Mechanisms**. v. 6, n. 4, p.889-895, jul. 2013.

GAUDET, A. D.; POPOVICH, P. G.; RAMER, M. S. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. **Journal of Neuroinflammation**. v. 8, n. 110, p. 1-13, 2011.

GERIN, C. et al. Motor activity induce release of serotonin in the dorsal horn of the rat lumbar spinal cord. **Neuroscience Letters**. v. 436, n. 2, p. 91-95, mai. 2008.

GEBHART, G. F. Descending modulation of pain. **Neuroscience and Behavioral Reviews**. v. 27, n. 8, p. 729-737, 2004.

GLAZNER, G. W.; MORRISON, A. E.; ISHII, D. N. Elevated insulin-like growth factor (IGF) gene expression in sciatic nerves during IGF-supported nerve regeneration. **Brain Research. Molecular Brain Research**. v. 25, n. 3-4, p. 265-272, set. 1994.

GOLDFARB, A. H. et al. Plasma beta-endorphin concentration: response to intensity and duration of exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. v. 22, n. 2, p. 241-244, abr. 1990.

GOLDSPINK, G. Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. **Journal of Anatomy**. v. 194, p. 323-334, abr. 1999.

GOLDSPINK, G.; YANG, S. Y. Effects of activity on growth factor expression. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**. v. 11, p. S21-S27. 2001.

GOLDSPINK, G.; WESSNER, B.; BACHL, N. Growth factors, muscle function and doping. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 8, p. 352-357, mar. 2008.

GORDON, T. The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. **Neurocirurgical Focus**. v. 26, n. 2 (E3), p. 1-10, fev. 2009.

HANSSON, H. A. et al. Evidence indicating trophic importance of IGF-1 in regenerating peripheral nerves. **Acta Physiologica Scandinavica**. v. 126, p. 609-614, 1986.

HAMEED, M. et al. Effects of eccentric cycling exercise on IGF-I splice variant expression in the muscles of young and elderly people. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**. v. 18, n. 4, ago. 2008.

HEEMST, D. V. Insulin, IGF-1 and longevity. **Anging and Disease**. v. 1, n. 2, p. 147-157, out. 2010.

HOSSEINZADEH, M. et al. Pain sensitivity is normalized after a repeated bout of eccentric exercise. **European Journal of Applied Physiology**. v. 113, n. 10, p. 2595-2602, out. 2013.

HOWATSON, G.; van SOMEREN, K. A. The prevention and treatment of exercise-induced muscle damage. **Sports Medicine**. v. 38, n. 6, p. 483-503, 2008.

HUTCHINSON, K. J. et al. Three exercise paradigms differentially improve sensory recover after spinal cord contusion in rats. **Brain**. v. 127, n. 6, p. 1403-1414, jun. 2004.

HYLDAHL, R. D.; HUBAL, M. J. Lengthening our perspective: morphological, cellular and molecular responses to eccentric exercise. **Muscle & Nerve**. v. 49, n. 2, p. 155-170, fev. 2014.

INSERRA M. M. et al. Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse. **Microsurgery**, v. 18, n. 2, p.119-24, 1998.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. **Pain**. v. 137, n. 3, p. 473-477, jul. 2008.

ISNER-HOROBETI, M. E. et al. Eccentric Exercise training: modalities, applications and perspectives. **Sports Medicine**, v. 43, n. 6, p. 483-512, jun. 2013.

JACOBS, B. L.; MARTÍN-CORA, F. J.; FORMAL, C. A. Activity of medullary serotonergic neurons in freely moving animals. **Brain Research Reviews**. v. 40, n. 1-3, p. 45-52, out. 2002.

JENSEN, T. S.; MADSEN, C. S.; FINNERUP, N. B. Pharmacology and treatment of neuropathic pains. **Current Opinion in Neurology**. v. 22, n. 5, p. 467-474, out. 2009.

JONES, D. M. et al. The synergistic effects of NGF and IGF-1 on neurite growth in adult sensory neurons: convergence on the PI 3-kinase signaling pathway. **Journal of Neurochemistry**. v. 86, p. 1116-1128, 2003.

JUNG, S. Y. et al. Treadmill exercise reduces spinal cord injury-induced apoptosis by activating the PI3K/Akt pathways in rats. **Experimental and Therapeutic Medicine**. v. 7, p. 587-593, 2014.

KANDEL, E. R. et al. **Principles of Neural Science**. 5. United States of America: McGraw-Hill, 2013.

KANJE, M.; SKOTTNER, A.; LUNDBORG, G. Effects of growth hormone treatment on the regeneration of rat sciatic nerve. **Brain Research**. v. 475, n. 2, p. 254-258, dez. 1988.

KEHL, L. J.; TREMPER, T. M.; HARGREAVES, K. M. A new animal model for assessing mechanisms and management of muscle hyperalgesia. **Pain**, v. 85, n. 3, p. 333-343, 2000.

KIERNAN, J.A. **Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice**. London. Oxford: Butterworth-Heinemann. 2004.

KIM, M. W. et al. Exercise increased BDNF and trkB in the contralateral hemisphere of the ischemic rat brain. **Brain research**, v. 1052, n. 1, p. 16-21, 2005.

KOHL, H. W. 3rd et al. The pandemic of physical inactivity: global action for public health. **Lancet**. v. 380, n. 9838, p. 294-305, jul. 2012.
KOLTYN, K. F.; UMEDA, M. Contralateral attenuation of pain after short-duration submaximal isometric exercise. **The Journal of Pain**. v. 8, n. 11, p. 887-892, nov. 2007.

KOLTYN, K. F. et al. Mechanisms of exercise-induced hypoalgesia. **The Journal of Pain**. v. 15, n. 12, p. 1294-1304, dez. 2014.

KURAIISHI, Y. et al. Separate involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algesic tests. **Brain Research**. v. 273, p. 245-252, 1983.

LAPIER, T. K. et al. Alterations in intramuscular connective tissue after limb casting affect contraction-induced muscle injury. **Journal of Applied Physiology**. v. 78, n. 3, p. 1065-1069, mar. 1995.

LASTAYO, P. C. et al. Eccentric muscle contractions: their contribution to injury, prevention, rehabilitation, and sport. **Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy**. v. 33, n. 10, p. 557-571, out. 2003.

LASTAYO, P. C. The feasibility and efficacy of eccentric exercise with older cancer survivors: a preliminary study. **Journal of Geriatric Physical Therapy**. v. 33, n. 3, p. 135-140, jul.-set. 2010.

LECKIE, R. L. BDNF mediates improvements in executive function following a 1-year exercise intervention. **Frontiers in Human Neuroscience**. v. 8, p. 1-12, dez. 2014.

LIEBER, R. L.; FRIDÉN, J. Mechanisms of muscle injury after eccentric contraction. **Journal of Science and Medicine in Sport**. v. 2, n. 3, p. 253-265, out. 1999.

LLORES-MARTÍN, M.; TORRES-ALEMÁN, I.; TREJO, J. L. Growth factors as mediators of exercise actions on the brain. **Neuromolecular Medicine**. v. 10, n. 2, p. 99-107, 2008.

LLORES-MARTÍN, M.; TORRES-ALEMÁN, I.; TREJO, J. L. Exercise modulates insulin-like growth factor 1-dependent and -independent effects on adult hippocampal neurogenesis and behaviour. **Molecular and Cellular Neurosciences**. v. 44, n. 2, p. 109-117, jun. 2010.

LYNCH, M. E. et al. A systematic review of the effect of waiting for treatment for chronic pain. **Pain**, v. 136, p. 97-116, 2008.

MANNICHE, C. et al. Intensive dynamic back exercises for chronic low back pain: a clinical trial. **Pain**. v. 47, p. 53-63, 1991.

MARTINS, D. F. **Mobilização neural como recurso terapêutico na recuperação funcional e morfológica do nervo ciático de ratos após lesão traumática**. 2008. p. 70. Dissertação de mestrado (Neurociências)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

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

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

MAZZARDO-MARTINS, L. et al. High-intensity extended swimming exercise reduces pain-related behavior in mice: involvement of endogenous opioids and the serotonergic system. **The Journal of Pain**. v. 11, n. 12, p. 1384-1393, dez. 2010.

MAZZARDO-MARTINS, L. et al. Glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418 decreases neuropathic pain in mice: evidence for the mechanisms of action. **Neuroscience**. v. 226, p. 411-420, dez. 2012.

MCCMAHON, G. et al. Muscular adaptations and insulin-like growth factor-I (IGF-I) responses to resistance training are stretch-mediated. **Muscle & Nerve**. v. 49, n. 1, p. 108-119, jan. 2014.

MEOTTI, F. C. et al. Anti-allodynic property of flavonoid myricitrin in models of persistent inflammatory and neuropathic pain in mice. **Biochemical Pharmacology**. v. 72, n. 12, p. 1707-1713, dez. 2006.

MOFFAT, R.; RAE, C. P. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**. v. 12, n. 1, p. 12-15, 2011.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews. Immunology**. v. 8, n. 12, p. 958-969, dez. 2008.

MURPHY, P. G. et al. Induction of interleukin-6 in axotomized sensory axons. **The Journal of Neuroscience**. v. 15, n. 7, p. 5130-5138, jul. 1995.

NADEAU, S. Functional recovery after peripheral nerve injury is dependent on the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF: implications for neuropathic pain. **The Journal of Neuroscience**. v. 31, n. 35, p. 12533-12542, ago. 2011.

NAUGLE, K. M.; FILLINGIM, R. B.; RILEY, J. L. III. A meta-analytic review of the hypoalgesic effects of exercise. **The Journal of Pain**. v. 13, n. 12, p. 1139-1150, dez. 2012.

NAVALTA, J. W.; SEDLOCK, D. A.; PARK, K. S. Physiological responses to downhill walking in older and younger individuals. **Journal of Exercise Physiology**. v. 7, n. 6, p. 45-51, dez. 2004.

NAVARRO, X.; VIVÓ, M.; VALERO-CABRÉ, A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. **Progress in Neurobiology**. v. 82, n. 4, p. 163-201, jul. 2007.

NIJS, J. et al. Dysfunctional endogenous analgesia during exercise in patients with chronic pain: to exercise or not to exercise? **Pain Physician**. v. 15, n. 3 (supl.), jul. 2012.

NINDL, B. C.; PIERCE, J. R. Insulin-like growth factor I as a biomarker of health, fitness, and training status. **Medicine & Science in Sports & Exercise**. v. 42, n. 1, p. 39-49, 2010.

NUCCI, C. et al. Oleaginous extract from the fruits *Pterodon pubescens* Benth induces antinociception in animal models of acute and chronic pain. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 143, n. 1, p. 170-178, ago. 2012.

OBATA, K. et al. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. **The Journal of Clinic Investigation**. v. 115, n. 9, p. 2393-2401, set. 2005.

OLIVEIRA, C. M. B. et al. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 61, n. 2, p. 255-265, mar.-abr., 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Normative guidelines on pain management report of a delphi study to determine the need for guidelines and to identify the number and topics of guidelines that should be developed by OMS [2007]**. Disponível em: <www.OMS.int>. Acesso em: 11 mar. 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Scoping document for OMS: guidelines for the pharmacological treatment of persisting pain in adults with medical illnesses [2012]**. Disponível em: <www.OMS.int>. Acesso em: 11 mar. 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Global recommendations on physical activity for health**. Disponível em: <http://www.OMS.int/dietphysicalactivity/factsheet_recommendations/en/>. Acesso em: 02 abr. 2013.

PARK, K. S. et al. Leukocyte apoptosis and pro-/anti-apoptotic proteins following downhill running. **European Journal of Applied Physiology**. v. 111, n. 9, p. 2349-2357, set. 2011.

PARK, J. S.; HÖKE, A. Treadmill exercise induced functional recovery after peripheral nerve repair is associated with increased levels of neurotrophic factors. **Plos One**. v. 8, n. 3, p. 1-7, mar. 2014.

PARKITNA, J. R. Effects of glycogen synthase kinase 3beta and cyclin-dependent kinase 5 inhibitors on morphine-induced analgesia and tolerance in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 319, n. 2, p. 832-839, nov. 2006.

PEDERSEN, B. K. Muscle as a secretory organ. **Comprehensive Physiology**. v. 3, n. 3, p. 1337-1362, jul. 2013.

PERTOVAARA, A. The noradrenergic pain regulation system: a potential target for pain therapy. *European Journal of Pharmacology*. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299913001659>>. Acesso em: set. 2013.

PERTUSA, M. et al. Mutagenesis and Temperature-Sensitive Little Machines. In: MISHRA, R. (Ed.). **Biochemistry, Genetics and Molecular Biology**. Valparaíso: Universidad de Santiago de Chile, 2012.

PHILIPPOU, A. et al. The role of the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in skeletal muscle physiology. **In Vivo**. v. 21, p. 45-54, 2007.

PHILIPPOU, A.; BARTON, E. R. Optimizing IGF-1 for skeletal muscle therapeutics. **Growth Hormone & IGF Research**. v. 24, n. 5, p. 157-163, out. 2014.

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, abr. 2004.

PLOUGHMAN, M. et al. Endurance exercise regimens induce differential effects on brain-derived neurotrophic factor, synapsin-I and insulin-like growth factor I after focal ischemia. **Neuroscience**, v. 136, n. 4, p. 991-1001, 2005.

PU, S. F.; ZHUANG, H. X.; ISHII, D. N. Differential spatio-temporal expression of the insulin-like growth factor genes in regenerating sciatic nerve. **Molecular Brain Research**. v. 34, n. 1, p. 18-28, dez. 1995.

PU, S. F. et al. Time-dependent alteration of insulin-like growth factor gene expression during nerve regeneration in regions of muscle enriched with neuromuscular junctions. **Molecular Brain Research**. v. 63, n. 2, p. 207-216, jan. 1999.

RABINOVSKY, E.; DEBAKEY, M. E. The multifunctional role of IGF-1 in peripheral nerve regeneration. **Neurological Research**. v. 26, p. 204-210, mar. 2004.

RAICHLIN, D. A. et al. Exercise-induced endocannabinoid signaling is modulated by intensity. **European Journal of Applied Physiology**. v. 113, p. 869-875, 2013.

RAIVICH, G. et al. The expression of growth factors during nerve regeneration. **Restorative Neurology and Neuroscience**. v. 1, n. 3, p. 217-223, jan. 1990.

RINGKAMP, M; MEYER, R. A. Physiology of Nociceptors. In: BASBAUM, A. I. et al. Vol. 5 **The Senses: a Comprehensive Reference**. Elsevier: Canada, 2008.

SABATIER, M. J. et al. Treadmill training promotes axon regeneration in injured peripheral nerves. **Experimental Neurology**. v. 211, p. 489-493, mar. 2008.

SAKOWSKI, S. A.; FELDMAN, E. L. Insulin-like growth factors in the peripheral nervous system. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**. v. 41, n. 2, p. 375-393, jun. 2012.

SANDKHÜLER, J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. **Physiological Reviews**. v. 89, n. 2, p. 707-758, abr., 2009.

SAWYNOK, J. Adenosine receptor activation and nociception. **European Journal of Pharmacology**. v. 317, n. 1, p. 1-11, 1998.

SEDDON, H. Three types of nerve injury. **Brain**. v. 66, p. 237-288, 1943.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. v. 10, n. 11, p. 1361-1368, nov. 2007.

SHAVLAKADZE, T. et al. Insulin-like growth factor I slows the rate of denervation induced skeletal muscle atrophy. **Neuromuscular Disorders**. v. 15, n. 2, p. 139-146, fev. 2005.

SINISCALCO, D.; ROSSI, F.; MAIONE, S. Molecular Approaches for Neuropathic Pain Treatment. **Current Medicinal Chemistry**. v. 14, n. 16, p. 1783-1787, 2007.

SMITH, B. H.; TORRANCE, N. Epidemiology of neuropathic pain and its impact on quality of life. **Current Pain and Headache Reports**. v. 16, n. 3, p. 191-198, jun. 2012.

SONG, Y. H. et al. The therapeutic potential of IGF-1 in skeletal muscle repair. **Trends in Endocrinology and Metabolism**. v. 24, n. 6, p. 310-319, jun. 2013.

SOUZA, J. B. de. Poderia a atividade física induzir analgesia em pacientes com dor crônica? **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. v. 15, n. 2, p. 145-150, 2009.

STEEDS, C. E. The anatomy and physiology of pain. **Surgery**. v. 31, n. 2, 49-53, 2013.

STEMKOWSKI, P. L.; ZAMPONI, G. W. The tao of igf-1: insulin-like growth factor receptor activation increases pain by enhancing t-type calcium channel activity. **Science Signaling**. v. 7, n. 346, p. pe23, out. 2014.

SULLIVAN, K. A.; KIM, B.; FELDMAN, B. L. Minireview: insulin-like growth factors in the peripheral nervous system. **Endocrinology**. v. 149, n. 12, p. 5963-5971, dez. 2008.

SUNDERLAND, S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. **Brain**. v. 74, n. 4, p. 491-516, 1951.

SZABADI, E. Modulation of physiological reflexes by pain: role of the locus coeruleus. **Frontiers in Integrative Neuroscience**. v. 6, p. 1-15, 2012.

TSUMIYAMA, W. et al. Evaluation of the lactate threshold during downhill running in rats. **Journal of Physical Therapy Science**. v. 26, n. 1, p. 125-126, jan. 2014a.

TSUMIYAMA, W. et al. Induction of Muscle Hypertrophy in Rats through Low Intensity Eccentric Contraction. **Journal of Physical Therapy Science**. v. 26, n. 10, p. 1623-1625, out. 2014b.

UDINA, E. et al. Effects of activity-dependent strategies on regeneration and plasticity after peripheral nerve injuries. **Annals of Anatomy**. v. 193, p. 347-353, 2011.

VELLOSO, C. P. Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-1. **British Journal of Pharmacology**. v. 153, n. 3, p. 557-568, jun. 2008.

VIDAL, P. M. et al. The role of “anti-inflammatory” cytokines in axon regeneration. **Cytokine & Growth Factors Reviews**. v. 24, n. 1, p. 1-12, fev. 2013.

VOGEL, C. et al. Absence of thermal hyperalgesia in serotonin transporter-deficient mice. **The Journal of Neuroscience**. v. 23, n. 2, p. 708-715, jan. 2003.

VOSCOPOULOS, C.; LEMA, M. When does acute become chronic pain? **British Journal of Anesthesia**. v. 105, suppl. 1, p. i69-i85, dez. 2010.

WALT, A. V. D. et al. Neuroprotection in multiple sclerosis: a therapeutic challenge for the next decade. **Pharmacology & therapeutics**, v. 126, n. 1, p. 82-93, 2010.

WESTERGA J., GRAMSBERGEN, A. The development of locomotion in the rat. **Development Brain Research**, v.57, p. 163-174, 1990.

WILHELM, J. C. et al. Cooperative roles of BDNF expression in neurons and schwann cells are modulated by exercise to facilitate nerve regeneration. **The Journal of Neuroscience**. v. 32, n. 14, p. 5002-5009, 2012.

YANG, J. et al. Lactate promotes plasticity gene expression by potentiating NMDA signaling in neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 111, n. 33, p. 12228-12233, dez. 2014.

ZHANG, Y. et al. Peripheral pain is enhanced by insulin-like growth factor 1 through a G protein-mediated stimulation of T-type calcium channels. **Science Signaling**. v. 7, n. 346, p. ra94, out. 2014.

ZHONG, J. et al. Sensory impairments and delayed regeneration of sensory axons in interleukin-6-deficient mice. **The Journal of Neuroscience**. v. 19, n. 11 , p. 4305-4313, jun. 1999.

ZHUANG, H. X. Insulin-like growth factors reverse or arrest diabetic neuropathy: effects on hyperalgesia and impaired nerve regeneration in rats. **Experimental Neurology**. v. 140, n. 2, ago. 1996.

ZOCHODNE, D. W. Neurobiology of peripheral nerve regeneration. **Cambridge: Cambridge University Press**, 2008.