

**Universidade de São Paulo (USP)**  
**Instituto de Psicologia**  
**Psicologia Experimental**  
**Neurociências e Comportamento**

**Jorge William Martins**

**Avaliação da intensidade do exercício físico sobre o seu efeito antinociceptivo em modelo experimental de neuropatia periférica utilizando a máxima fase estável do lactato como marcador da capacidade aeróbica**

**dissertação**

**São Paulo-SP**  
**2018**

**Jorge William Martins**

**Avaliação da intensidade do exercício físico sobre o seu efeito antinociceptivo em modelo experimental de neuropatia periférica utilizando a máxima fase estável do lactato como marcador da capacidade aeróbica**

Qualificação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Comportamento (NEC), Universidade de São Paulo(USP) como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em ciências da saúde .

Orientador: Guilherme de Araujo Lucas

**São Paulo-SP  
2018**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE  
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,  
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação  
Biblioteca Dante Moreira Leite  
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo  
Dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Martins, Jorge William

Avaliação da intensidade do exercício físico sobre o seu efeito antinociceptivo em modelo experimental de neuropatia periférica utilizando a máxima fase estável do lactato como marcador da capacidade aeróbica / Jorge William Martins; orientador Guilherme Araújo Lucas. -- São Paulo, 2018.

55 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento) -- Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2018.

1. Dor crônica. 2. Chronic pain. 3. Máxima fase estável do lactato (MFEL). 4. Exercício físico. I. Araújo Lucas, Guilherme, orient. II. Título.

**Jorge William Martins**

**Avaliação da intensidade do exercício físico sobre o seu efeito antinociceptivo em modelo experimental de neuropatia periférica utilizando a máxima fase estável do lactato como marcador da capacidade aeróbica**

**IMPORTANTE:** ESSE É APENAS UM TEXTO DE EXEMPLO DE FOLHA DE APROVAÇÃO. VOCÊ DEVERÁ SOLICITAR UMA FOLHA DE APROVAÇÃO PARA SEU TRABALHO NA SECRETARIA DO SEU CURSO (OU DEPARTAMENTO).

Trabalho aprovado. São Paulo-SP, DATA DA APROVAÇÃO:

---

**Guilherme de Araujo Lucas**  
Orientador

---

**Professor**  
Convidado 1

---

**Professor**  
Convidado 2

**São Paulo-SP**  
**2018**

*Dedicatória:*

*Dedico esta dissertação ao meu orientador Prof. Dr. Guilherme de Araújo Lucas, agradeço pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório.*

*Agradeço a Sonia Zanom pela paciência em ensinar os caminhos e a rotina do laboratório.*

*Muito obrigado a Andrea Carvalho, pelas vezes que me ajudou para que este trabalho fosse concluído sua participação foi fundamental.*

*Ao amigo Bruno Pereira, parceiro de muitas horas, por enxergar potencial em mim, o percursor da ideia de cursar o mestrado, muito obrigado, por tudo!*

*Enfim, agradeço a todos que participaram diretamente e indiretamente para que este trabalho fosse concluído, serei eternamente grato!*

## Resumo

A dor crônica atinge grande parte da população mundial 7% a 8%(FREITAS, 2015b) Estes números mostram a prevalência e necessidade de estudar os mecanismos da dor neuropática a fim de contribuir para a melhora deste quadro no Brasil e no mundo.

Lesões de nervo periférico causam, frequentemente, alterações sensoriais crônicas, particularmente, aquelas associadas ao sistema nociceptivo (GAO; JI, 2010). A dor crônica de origem neuropática é uma síndrome incurável que ocorre pela lesão do sistema nervoso central ou periférico e caracteriza-se por alodínea, hiperalgesia, ativação espontânea de nociceptores e expansão da área hipersensibilizada, o tratamento farmacológico para restaurar a função sensorial após a lesão de nervo periférico tem pouco ou nenhum sucesso, tornando fundamental o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e a identificação de seus mecanismos de ação ((J *et al.*, 2012) NIZARD *et al.*, 2012; (KK., 2008; JIANG, 2010) (J *et al.*, 2012; JAIN, 2008; JIANG, 2010) sabendo que dos benefícios do exercício físico o objetivo deste estudo foi estudar os mecanismos desencadeados pelo exercício (5 sessões de treino, natação, de 20 minutos com intervalo de 48 horas nas intensidades 30, 50 e 75% da MFEL) mudanças fenotípicas, proteicas, do grupo de animais com lesão no nervo e relaciona-las com a melhor resposta nociceptiva. A atividade física será quantificada e monitorada através da MFEL e relacionada com alterações crônicas da sensibilidade somática, a fim de planejar uma estratégia de treinamento que tenha os melhores benefícios provocados pelo exercício.

Resultados: a quantificação de treino através da MFEL estipulou a carga de 3.25%, 3.15% e 2.74% do peso corporal respectivamente para os grupos controle, lesão fictícia e lesão. Conclusão: Foi determinada a máxima fase estável do lactato para o modelo de dor neuropática, possibilitando assim a construção do protocolo de exercício físico. A menor carga de exercício, 50% da MFEL, promoveu analgesia nos animais que praticaram natação. Não Existem diferenças nas intensidades 50 e 75% da MFEL, em relação a nocicepção ,avaliado pelo teste de sensibilidade mecânica.

## Abstract

### Abstract

Chronic pain affects a large part of the world population 7% to 8% (FREITAS, 2015), These figures show the prevalence and necessity of studying the mechanisms of neuropathic pain in order to contribute to the improvement of this situation in Brazil and in the world.

Peripheral nerve lesions often cause chronic sensory changes, particularly those associated with the nociceptive system (GAO; JI, 2010). Chronic pain of neuropathic origin is an incurable syndrome that occurs due to injury of the central or peripheral nervous system and is characterized by alodyne, hyperalgesia, spontaneous activation of nociceptors and expansion of the hypersensitized area, pharmacological treatment to restore sensory function after injury of the peripheral nerve has little or no success, making fundamental the development of new therapeutic strategies and the identification of its mechanisms of action (NIZARD et al., 2012; JAIN, 2008; G et al., 2010). The objective of this study was to study the mechanisms triggered by the exercise (5 training sessions, swimming, of 20 minutes with 48 hour intervals in the intensities 30, 50 and 75% of MFEL) phenotypic and protein changes of the group of animals with lesion on the nerve and relates them to the best nociceptive response. Physical activity will be quantified and monitored through MFEL and related to chronic changes in somatic sensitivity in order to plan a training strategy that has the best benefits of exercising.

Results: The training quantification through MFEL stipulated the load of 3.25%, 3.15% and 2.74% of body weight respectively for the control, fictitious lesion and injury groups. Conclusion: The maximum stable phase of lactate was determined for the neuropathic pain model, thus enabling the construction of the physical exercise protocol. The lower exercise load, 50% of MFEL, promoted analgesia in the animals that practiced swimming. No There are differences in the intensities 50 and 75% of MFEL, in relation to nociception, evaluated by the mechanical sensitivity test.

## Lista de ilustrações

Figura 1 – Tipos de dor . . . . .	15
Figura 2 – fenômeno da supercompensação . . . . .	25
Figura 3 – Metabolismo da glicose no tecido cerebral. . . . .	27
Figura 4 – Dinâmica do lactato nas transições de gases metabólicos . . . . .	28
Figura 5 – Intensidade relacionada ao LV1 e LV2 de acordo com VE/VO <sub>2</sub> e VE/VCO <sub>2</sub>	31
Figura 6 – Intensidade relacionada ao limiar anaerobio individual (IAT) . . . . .	31
Figura 7 – Determinação do protocolo de lactato mínimo. . . . .	32
Figura 8 – Determinação da deflexão da frequência cardíaca . . . . .	33
Figura 9 – Desenho experimental. . . . .	37
Figura 10 – Nervo isquiático com ligadura parcial de 1/3 a 1/2 do nervo isquiático modelo de (Z, R e Y 1990). . . . .	39
Figura 11 – Visão superior (A) e lateral (B) do tanque de treinamento para camundongos.	40
Figura 12 – Grupos de animais intactos (controle) .A - Comportamento da curva de lactato no teste incremental . B - Máxima fase estável do lactato correspondente a 3,25 % do peso corporal . . . . .	44
Figura 13 – Grupos de animais Lesão fictícia .B- Comportamento da curva de lactato no teste incremental . B - Máxima fase estável do lactato correspondente a 3,15 % do peso corporal . . . . .	45
Figura 14 – Grupos lesão parcial do nervo isquiático. E- - Comportamento da curva de lactato no teste incremental . F- Máxima fase estável do lactato correspondente a 2,75 % do peso corporal . . . . .	45
Figura 15 – Concentração de lactato(lactacidemia) e identificação da maxima fase estavel (MFEL). . . . .	46
Figura 16 – Teste algométrico . . . . .	46
Figura 17 – Efeito da atividade física sobre a expressão de p38MAPK e da sua forma fosforilada após lesão de nervo periférico. . . . .	47
Figura 18 – Efeito da atividade física sobre a expressão de GFAP após lesão de nervo periférico. . . . .	48
Figura 19 – <b>textbfPROTOCOLO EXPERIMENTAL APROVADO PELO CEUA-FMRP-USP NO.095/2015.</b> . . . .	57



**Lista de quadros**

Quadro 1 – Causas frequentes da dor neuropática. . . . . 16

### Lista de gráficos

Gráfico 1 – Sensibilidade somática . . . . .	20
Gráfico 2 – – Comportamento do lactato sanguíneo durante um teste de cargas incrementais para determinação do limiar de lactato (LL) e do limiar anaeróbio (LAn) durante a corrida . . . . .	34
Gráfico 3 – Protocolo de determinação da máxima fase estável de lactato (MFEL) sanguíneo durante a corrida. . . . .	34

### **Lista de tabelas**

Tabela 1 – Determinação da resposta máxima do estado estável de lactato em eventos esportivos selecionados. . . . .	29
Tabela 2 – Protocolo Experimental . . . . .	41

### **Lista de abreviaturas e siglas**

AMPA	alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF, do inglês Brain-derived neurotrophic factor)
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
GABA	ácido gama-aminobutírico
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
IASP	Associação internacional para estudo da dor
LV	Leishmaniose Visceral
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógenos
MFEL	máxima fase estável do lactato
NMDA	Receptor N-metil D-aspartato
O <sub>2</sub>	Oxigênio
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
SNC	Sistema Nervoso Central
UNESP	Universidade Estadual Paulista
VE	Ventrículo Esquerdo

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>14</b>
<b>1.1</b>	<b>Dor</b>	<b>14</b>
<b>1.2</b>	<b>Mecanismos da dor neuropática</b>	<b>16</b>
<b>1.3</b>	<b>Sensibilização dos nociceptores</b>	<b>17</b>
<b>1.4</b>	<b>Excitabilidade ectópica anormal de neurônios aferentes</b>	<b>17</b>
<b>1.5</b>	<b>Facilitação pronociceptiva.</b>	<b>17</b>
<b>1.6</b>	<b>Tratamento</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>Exercício físico</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Neuroproteção e exercício físico</b>	<b>21</b>
<b>2.2</b>	<b>Efeitos do exercício físico sobre a resposta inflamatória</b>	<b>22</b>
<b>2.3</b>	<b>Micróglia</b>	<b>23</b>
<b>2.4</b>	<b>Ação do exercício físico na microglia e bdnf.</b>	<b>23</b>
<b>2.5</b>	<b>Carga de treinamento</b>	<b>24</b>
<b>2.6</b>	<b>Quantificação de carga</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>Lactato</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Dinâmica do lactato no incremento da carga</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>Máxima fase estável de lactato (MFEL)</b>	<b>29</b>
<b>4.1</b>	<b>Métodos indiretos</b>	<b>30</b>
<b>5</b>	<b>Objetivos</b>	<b>36</b>
<b>5.1</b>	<b>Objetivo geral</b>	<b>36</b>
<b>5.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>36</b>
<b>5.2.1</b>	Monitorar a MFEL em camundongos sedentários com lesão parcial ou fictícia do nervo isquiático submetidos à natação.	<b>36</b>
<b>5.2.2</b>	Correlacionar alterações da MFEL com respostas sensoriais provocadas por estímulo mecânico periférico, em camundongos sedentários com lesão parcial ou fictícia do nervo isquiático submetidos à natação.	<b>36</b>
<b>5.2.3</b>	Determinar a menor carga e volume de trabalho físico (natação) capaz de promover a melhor recuperação sensorial em camundongos com neuropatia periférica.	<b>36</b>
<b>5.2.4</b>	Investigar as mudanças fenótipos, proteicas, do grupo de animais com lesão no nervo e relaciona-las com a melhor resposta nociceptiva.	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>Desenho experimental</b>	<b>37</b>
<b>7</b>	<b>Materiais e Métodos</b>	<b>38</b>
<b>7.1</b>	<b>Animais</b>	<b>38</b>

7.2	Modelo experimental de neuropatia periférica . . . . .	38
7.3	Teste algesimétrico . . . . .	39
7.4	Exercício físico . . . . .	39
7.5	Grupos experimentais . . . . .	40
7.6	Determinação da Máxima Fase Estável de Lactato . . . . .	42
7.7	Protocolos de treinamento . . . . .	42
7.8	Imunodeteccção de proteínas na coluna dorsal da medula espinal. . . . .	43
7.9	Análise Estatística . . . . .	43
7.10	Aspectos éticos sobre o uso de animais de experimentação . . . . .	43
8	Resultados e discussão . . . . .	44
8.1	Teste de máxima fase estável do lactato para os grupos experimentais de neuropatia periférica. . . . .	44
8.2	teste algesímetro . . . . .	46
8.3	A atividade física não influencia a expressão e fosforilação de p38MAPK na coluna dorsal da medula espinal após lesão mecânica de nervo periférico. . . . .	47
8.4	Perfil de expressão GFAP . . . . .	48
9	conclusão . . . . .	50
	Referências . . . . .	51
	ANEXOS . . . . .	56

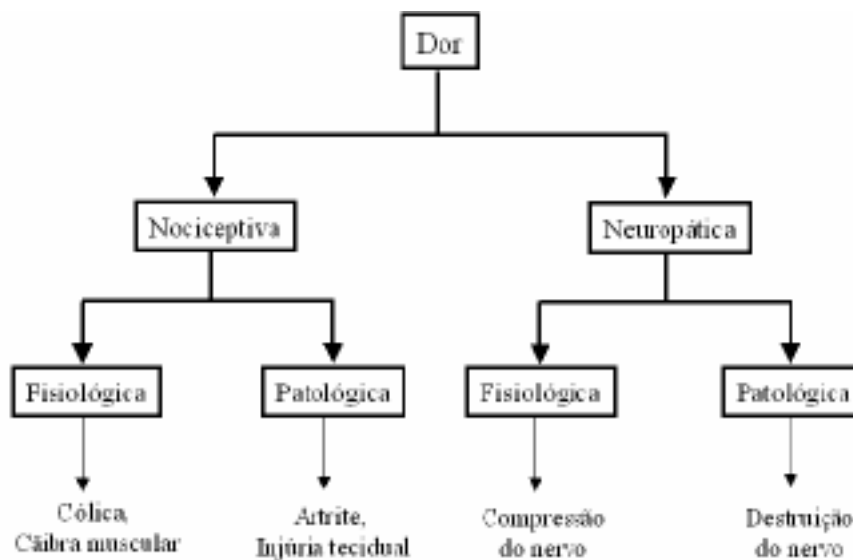
## 1 Introdução

A dor crônica atinge grande parte da população mundial 7% a 8%(FREITAS, 2015a) estes números mostram a prevalência e necessidade de estudar os mecanismos da dor neuropática e contribuir pra melhora deste quadro no Brasil e no mundo. Lesões de nervo periférico causam, frequentemente, alterações sensoriais crônicas, particularmente, aquelas associadas ao sistema nociceptivo (GAO; JI, 2010) . A dor crônica de origem neuropática é uma síndrome incurável que ocorre pela lesão do sistema nervoso central ou periférico e caracteriza-se por alodínea e hiperalgesia, ativação espontânea de nociceptores e expansão da área hipersensibilizada. O tratamento farmacológico para restaurar a função sensorial após a lesão de nervo periférico tem pouco ou nenhum sucesso, tornando imperativo o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e a identificação de seus mecanismos de ação (J *et al.*, 2012) Estudos clínicos e experimentais têm mostrado que, após lesões do sistema nervoso, o exercício físico sistemático e prolongado melhora, significativamente, tanto a função motora quanto sensorial, estudos em modelos animais têm delineado alguns dos mecanismos celulares e moleculares associados à capacidade do exercício de promover alterações na transmissão sináptica e recuperar algumas funções neuronais(O. *et al.*, 2008; COBIANCHIA *et al.*, 2010) . Está claro que o efeito do exercício sobre o sistema nervoso vai muito além do simples aumento do fluxo sanguíneo regional e também não está restrito a regiões corticais associadas à execução de uma tarefa motora(DIXON, 1980; COBIANCHIA *et al.*, 2010) .O exercício físico pode ativar determinados circuitos neurais e, principalmente, modificar o mecanismo de ação de moléculas específicas, em particular, aquelas com características tróficas (HUTCHINSON *et al.*, 2004; JIANG, 2010) . Entretanto, são ainda desconhecidos, tanto o efeito do exercício físico sobre os sintomas sensoriais decorrente de neuropatia periférica, quanto os mecanismos de ação da atividade física sobre o desenvolvimento da alodínia e hipernocicepção decorrentes de lesão no nervo periférico, a quantificação ideal da carga de treinamento a fim de otimizar os benefícios da atividade física, também necessita de mais aprofundamento científico em relação nessas de enfermidades.

### 1.1 Dor

De acordo com a Associação Internacional Para Os Estudos Da Dor (IASP) o conceito de dor é: Uma experiência sensorial e emocional, desagradável associada a lesão tecidual, real ou potencial. Podem ser classificadas entre aguda ou crônica a diferença básica entre as duas é temporal a dor aguda, enquanto a dor aguda apresenta funções de proteção funciona como um alerta e adaptação é rápida e bem localizada induzindo mudanças que facilitem a descontinuidade do estímulo nocivo e recuperação do organismo o seu tempo duração trinta dias. A dor é crônica quando suas características duram mais que trinta dias ou após o tempo de cicatrização esperado, a literatura é conflituosa em relação ao tempo para se determinar a dor como crônica que pode variar de trinta até noventa dias, é constatada, normalmente devido a uma mudança fisiológica no sistema nociceptivo, o que afeta drasticamente a vida do indivíduo, envolvendo na sua fisiopatologia mecanismos de memória, cujas causas podem continuar ativas mesmo sem a presença do estímulo doloroso, sendo classificada segundo seu mecanismo fisiopatológico em três tipos: dor de predomínio nociceptivo, dor mista e dor de predomínio neuropático(1083, 2017) a figura 1 demonstra um esquema dos tipos de dor.

Figura 1 – Tipos de dor .



Schestatsky;Nascimento,2009.

Dor mista é a famosa dor no nervo isquiático, que irradia da coluna lombar para a parte posterior da coxa, Síndrome do canal cárpico, cervicobraquialgias, são formas da dor mista.

Dor nociceptiva ou inflamatória ocorre por ativação fisiológica de receptores de dor e está relacionada à lesão de tecidos ósseos, musculares ou ligamentares e tem a função de aviso e sinalização de danos iminentes ou reais nos tecidos, a dor nociceptiva preserva a integridade do corpo geralmente responde bem ao tratamento sintomático com analgésicos ou anti-inflamatórios não esteroides.

Dor neuropática é definida como dor iniciada por lesão ou disfunção do sistema nervoso,



central ou periférico, sendo mais bem compreendida como resultado da ativação anormal da via da dor ou nociceptiva a dor neuropática não responde bem aos analgésicos usuais.

A dor neuropática é classificada em central ou periférica, uma vez que apresenta manifestações clínicas e fisiopatológicas diferentes. Dor neuropática central envolve uma lesão ao nível do sistema nervoso central, patologias relacionadas com esta classificação de dor são

: Acidentes vasculares cerebrais (AVC), doença de Parkinson, esclerose múltipla, mielopatia pós-irradiação, mielopatia associada ao vírus da imunodeficiência humana (HIV), lesões tumorais e infecciosas. (Quadro-1)(SCHESTATSKY, 2008; SCHESTATSKY; NASCIMENTO, 2009) .

2

Quadro 1 – Causas frequentes da dor neuropática.

Topografia da dor	Estrutura	Exemplos
Sistema nervoso periférico	Nervo	Neuropatia diabética
		Neuralgia do trigêmeo
		Síndrome da dor regional complexa tipos I e II*
	Raiz dorsal	Neuropatia induzida por infiltração tumoral
		Neuropatia por compressão nervosa crônica (p. ex. STC)
		Neuralgia pós-herpética
Sistema nervoso central	Cérebro	Avulsão traumática de plexo braquial
		Pós – AVC
	Medula espinhal	Esclerose múltipla
		Trauma medular
		Isquemia medular

STC, síndrome do túnel do carpo; AVC, acidente vascular cerebral

\*Antigamente conhecidas como distrofia simpático-reflexa (tipo I) e causalgia (tipo II)

Rev HCPA 2008;28(3):177-87

## 1.2 Mecanismos da dor neuropática

A dor neuropática periférica pode acarreta em danos no nervo periférico, no plexo, no gânglio raquidiano da raiz dorsal ou na própria raiz dorsal do nervo raquidiano. Traumatismos, lesões vasculares, compressão e estiramento do nervo, exposição a toxinas relacionada com HIV

, diabetes ,síndrome do membro fantasma, pós-herpética, pós-irradiação, idiopática, nevralgias do trigêmeo, pós-traumáticas, polirradiculopatia desmielinizante inflamatória aguda e crônica, compressão radicular, síndrome doloroso regional complexo (SDCR) e tumores (por infiltração ou compressão nervosa e polineuropatia induzida por quimioterapia) são as condições clínicas mais frequentes (NICKEL. *et al.*, 2012)

### 1.3 Sensibilização dos nociceptores

Dor e nociceção são termos distintos,mas se relacionam ,nociceção se refere aos sinais que chegam ao sistema nervoso central resultado da ativação dos receptores sensoriais especializados denominados nociceptores , que fornecem informações sobre a lesão tecidual ocasionada por estímulos nocivos, a dor é consequência a estes estímulos nocivos, uma experiência emocional desagradável, que geralmente acompanha a nociceção.

Na dor nociceptiva e neuropática a sensibilização dos nociceptores é um mecanismo importante. Contribui para condições como o herpes zóster agudo, neuralgia pos herpética e síndrome de dor regional complexa. Estes são exemplos fundamentais para a coexistência de diferentes mecanismos nas síndromes de dor neuropática.Nociceptores são receptores com diferentes modalidades específicas de estímulo localizadas nas terminações nervosas livres de fibras C não mielinizadas e fibras A $\delta$  levemente mielinizadas, eles são ativados por estímulos químicos, térmicos e químicos nocivos e modulados por uma variedade de péptidos endógenos como a bradicinina, a substância P e o péptido relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Os nociceptores mecânicos são ativados especificamente por pressão e estresse mecânico.Os nociceptores sensíveis ao calor também detectam calor acima de um limiar de 43-45°C.

### 1.4 Excitabilidade ectópica anormal de neurônios aferentes

Sua função na dor é sustentada pela reversão dos efeitos nociceptivos por bloqueadores de canais de sódio não seletivos, nas fibras de A $\delta$  e C finas ou não mielinizadas, a excitabilidade alterada resulta em dor de laminação e queimação, ativos na dor neuropática de forma anormal (NICKEL. *et al.*, 2012; AMINOFF *et al.*, 2014)

### 1.5 Facilitação pronociceptiva.

Considerando que os mecanismos geralmente levam a sensações dolorosas espontâneas como hiperalgesia e alodinia, sinais clínicos relacionados à sensibilização central as fibras A $\delta$  e C nociceptivas aferentes primárias terminam em dois tipos de neurônios da coluna dorsal espinhal: neurônios de projeção espinhal e interneurônios.

Os neurônios de projeção espinal inervam centros neurais superiores, incluindo o tálamo e a área parabraquial, células intermediárias e áreas da coluna vertebral também estão indiretamente ligadas à entrada nociceptiva.

O glutamato é o principal transmissor excitatório no sistema nervoso central, incluindo o sistema de dor, existem três tipos de receptores de glutamato envolvidos na transmissão de sinais de dor periférica: ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazepropiônico (AMPA), N-metil-D- Receptor de aspartato (NMDA) e receptores de glutamato acoplados a metatrópica G-proteína (mGluR). O receptor AMPA ativado se torna mediador de respostas básicas aos estímulos dolorosos agudos, os receptores NMDA são fisiologicamente bloqueados por um íon de magnésio.

Esses mecanismos adaptativos resultam em maior excitabilidade dos neurônios centrais nociceptivos, que então se tornam ativados não apenas pela estimulação de baixo nível das fibras C e A $\delta$ , mas também pelas fibras A $\beta$ . Isso se reflete em campos receptivos ampliados de fibras nociceptivas na periferia e sensações dolorosas estimuladas, pelo estímulo como hiperalgesia e alodinia mecânica-dinâmica. Recentemente estudos mostraram que Após a lesão do nervo periférico, as células da micróglia da coluna vertebral, as células imunes do SNC, são convertidas de um estado de repouso para um estado ativo por meio de um conjunto de alterações fenotípicas e funcionais e desempenham um papel de manutenção da dor neuropática (INOUE *et al.*, 2014; TSUDA, 2005). As terminações nervosas periféricas feridas e os neurônios dorsais dorsais afetados indicam células de micróglia da coluna vertebral através de receptores purinérgicos, quimiocinas e receptores de quimiocinas, bem como moléculas imunes, que leva à ativação da proteína quinase (p38 MAPK), a micróglia ativada libera uma variedade de mediadores difusos incluindo citocinas pró inflamatórias como IL6, que induzem a uma hiperexcitabilidade em neurônios do corno dorsal, contribuindo para uma sinalização de dor mais intensa.

## 1.6 Tratamento

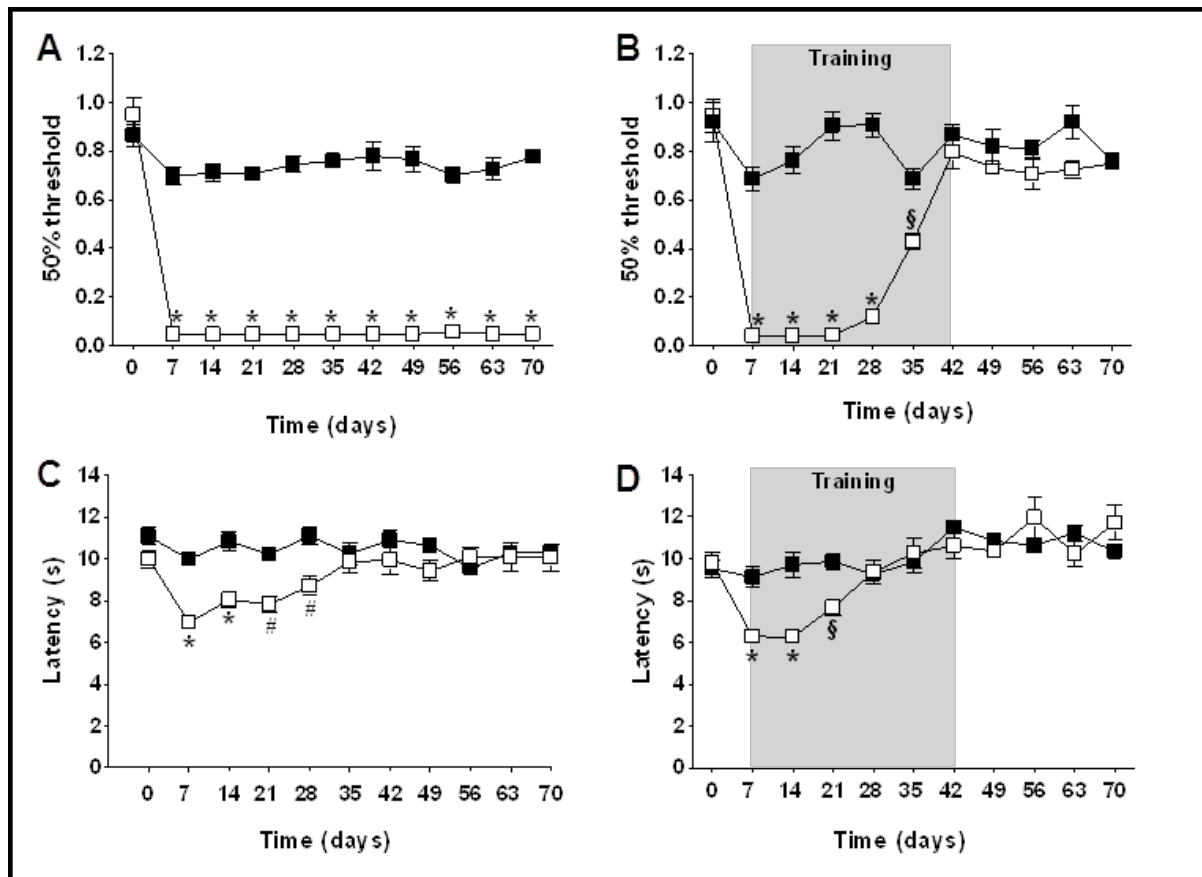
O tratamento farmacológico para restaurar a função sensorial após a lesão de nervo periférico tem pouco ou nenhum sucesso, tornando imperativo o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e a identificação de seus mecanismos de ação (KK., 2008; JIANG, 2010). Estudos clínicos e experimentais têm mostrado que, após lesões do sistema nervoso, o exercício

físico sistemático e prolongado melhora, significativamente, tanto a função motora, quanto a sensorial (AL *et al.*, 2013; SLUKA *et al.*, 2013; AB. *et al.*, 2012) . Entretanto, ainda são desconhecidos, tanto o efeito do exercício físico sobre os sintomas sensoriais decorrente de neuropatia periférica, quanto os mecanismos de ação da atividade física sobre o desenvolvimento da alodínia e da hipernocicepção decorrentes de lesão de nervo periférico.

Estudos em modelos animais têm delineado alguns dos mecanismos celulares e moleculares associados à capacidade do exercício de promover alterações na transmissão sináptica e recuperar algumas funções neu(COBIANCHIA *et al.*, 2010; BOGEN *et al.*, 2008) . Está claro que o efeito do exercício sobre o sistema nervoso vai muito além do simples aumento do fluxo sanguíneo regional e também não está restrito a regiões corticais associadas à execução de uma tarefa motora(Dixon 1980, Cobianchia *et al.* 2010) . O exercício físico pode ativar determinados circuitos neurais e, principalmente, modificar o mecanismo de ação de moléculas específicas, em particular, aquelas com características tróficas (G *et al.*, 2010)

Recentemente, demonstramos que a atividade física por cinco semanas foi capaz de reverter a alodínia mecânica e acelerou o processo de reversão da hiperalgesia térmica provocada pela lesão de nervo periférico (ALMEIDA *et al.*, 2015) (Fig. 1), o efeito antinociceptivo provocado pela atividade física permaneceu por, pelo menos, mais quatro semanas após a interrupção do treinamento. Nossos resultados indicam, ainda, que o treinamento físico por cinco semanas reverteu o aumento da proteína BDNF no gânglio da raiz dorsal da medula espinal provocado pela lesão do nervo periférico e normalizou a atividade de astrócitos e micróglia na coluna dorsal da medula espinal (Almeida *et al.* 2015).

Gráfico 1 – Sensibilidade somática



C. Almeida et al.·156 (2015) 504–513 PAIN

(A e B) e hipernocicepção térmica (C e D). (A) Sensibilidade somática em animais sedentários com lesão parcial do nervo isquiático (quadrado branco) e animais sedentários com lesão fictícia (quadrado preto) até 70 dias após lesão. (B) Sensibilidade somática em animais treinados com lesão parcial do nervo isquiático (quadrado preto) e em animais treinados com lesão fictícia (quadrado branco) até 42 dias após lesão e que posteriormente, passaram por um período de repouso de 42 a 70 dias após a lesão. Latência de sensibilidade térmica (teste de Hargreaves). (C) Latência de sensibilidade térmica em animais sedentários com lesão parcial do nervo isquiático (quadrado branco) e animais sedentários com lesão fictícia (quadrado preto) até 70 dias após lesão. (D) Latência de sensibilidade térmica em animais treinados com lesão parcial do nervo isquiático (quadrado branco) e em animais treinados com lesão fictícia (quadrado preto) até 42 dias após a cirurgia e, que posteriormente, passaram por um período de repouso até o 70º dia após a lesão. Valores representam as médias  $\pm$  erro padrão para  $n= 10-12/\text{grupo}$ , ANOVA para dois fatores, \*  $p < 0.001$ , #  $p < 0.01$  e §  $p < 0.05$ .

## 2 Exercício físico

É importante destacar a importância de se estabelecer o conceito e conseqüentemente a diferença entre atividade física e exercício físico, atividade física é uma expressão genérica que pode ser definida como qualquer movimento corporal, produzido pelos músculos esqueléticos, que resulta em gasto energético maior do que os níveis de repouso já o exercício físico ou treinamento físico é uma atividade física planejada, estruturada e repetitiva que tem como objetivo final ou intermediário aumentar, manter a saúde ou aptidão física (CHEIK *et al.*, 2003).

Embora os benefícios do exercício físico sobre a saúde sejam reconhecidos por séculos, foi somente na última década que os mecanismos neurobiológicos associados à atividade física foram, sistematicamente, investigados (Ang ET,;Gomez-Pinilla F, 2007; Rod K. Dishman et al., 2006). Estudos clínicos e experimentais têm evidenciado que o treinamento físico melhora, significativamente, a memória e o aprendizado, reduz o sintoma de depressão e desempenha um papel crucial na recuperação funcional da atividade neural (Ang ET,;Gomez-Pinilla F, 2007). Além disso, o exercício físico regular tem efeitos anti-inflamatórios e pode atuar na prevenção ou tratamento de diversas doenças (Gleeson M et al., 211). A atividade física desempenha um importante papel na prevenção e tratamento no declínio cognitivo relacionados a idade e patologias como diabetes tipo II, hipertensão, doença cardíaca, acidente vascular cerebral, osteoporose, câncer e obesidade e no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas relacionadas à idade, como a doença de Alzheimer. (Sergio Chieffi et al., 2017)

A relação da atividade física com seu efeito protetor tem sido assunto de estudo a décadas, mas o mecanismo responsável por tal feito está sendo revelado agora, recentemente, várias evidências sugerem que a atividade física é um método razoável e benéfico para melhora funcional de lesões do nervo periférico e central e retardar o processo de doenças neurodegenerativas, além de melhorar o sistema cardiovascular e imune, logo, a atividade física representa uma abordagem multifuncional e acima de tudo, não farmacológica, que modula fatores tróficos que por sua vez pode ser crítico no processo de neurodegeneração e regeneração. (Cobianchi S et al., 2017)

### 2.1 Neuroproteção e exercício físico

A neuroproteção é uma forma de prevenção dos mecanismos que conduzem à morte neuronal contrariando a cascata de eventos que conduz à morte celular e influencia o prognóstico funcional do indivíduo a longo prazo, minimizado por uma intervenção de cuidados. Consiste na resistência neuronal a um estímulo agressor (<http://ligaparaibanadeneurointensivismo.blogspot.com/2015/08/o-que-e-neuroprotecao.html>)

A ação neuroprotetora do exercício físico foi relacionada a sua capacidade de prevenção e modulação nas condições inflamatórias. Evidências mostram que menos infecções virais e bacterianas e menor incidência de inflamação e menor taxa de neurodegeneração e declínio cognitivo em praticantes de exercício físico. O efeito anti-inflamatório do exercício físico é

dependente de fatores críticos como a duração a intensidade do exercício e tipo de exercício adotado. o exercício pode gradualmente, moldar, cessar o processo inflamatório e levar a redução da inflamação crônica, caso seja praticado rotineiramente por outro lado o exercício agudo pode promover ou reduzir a inflamação atuando na cascata inflamatória que é aumentada de acordo a intensidade do exercício escolhido, liberando citocinas pró ou anti inflamatórias(Kohut, M.L. et al., 2006; Petersen, A.M.;Pedersen, B.K., 2005) ,estudos mostraram que exercícios aeróbios ao longo de 10 meses foi capaz de induzir a redução de interleucinas 6 (IL6), 8(IL8) e proteína c-reativa (PCR) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), no entanto, uma metanálise (Ploeger, H.E. et al., 2009) mostrou que um único exercício aumenta a resposta inflamatória em pacientes com diabetes de delitos tipo I, fibrose cística e doença pulmonar obstrutiva crônica, enquanto que o treinamento de resistência aeróbia foi associada a atenuação do sistema inflamatório sistêmica em pacientes com insuficiência cardíaca crônica e diabetes tipo II, assim a análise do efeito do exercício físico sobre doenças inflamatórias, em particular, devem ser conduzidas em relação com o mecanismo pelo qual os mediadores inflamatórios e os moduladores são produzidos na patologia específica pelo tipo de exercício a ser empregado.(Cobianchi S et al., 2017) .

## 2.2 Efeitos do exercício físico sobre a resposta inflamatória

A ação neuroprotetora do exercício físico foi relacionada a sua capacidade de prevenção e modulação nas condições inflamatórias. Evidencias mostram que menos infecções virais e bacterianas e menor incidência de inflamação e menor taxa de neurodegeneração e declínio cognitivo em praticantes de exercício físico. O efeito anti-inflamatório do exercício físico é dependente de fatores críticos como a duração a intensidade do exercício e tipo de exercício adotado. o exercício pode gradualmente, moldar, cessar o processo inflamatório e levar a redução da inflamação crônica, caso seja praticado rotineiramente por outro lado o exercício agudo pode promover ou reduzir a inflamação atuando na cascata inflamatória que é aumentada de acordo a intensidade do exercício escolhido, liberando citocinas pró ou anti inflamatórias(KOHUT *et al.*, 2006; PETERSEN; PEDERSEN, 2005) ,estudos mostraram que exercícios aeróbios ao longo de 10 meses foi capaz de induzir a redução de interleucinas 6 (IL6), 8(IL8) e proteína c-reativa (PCR) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), no entanto, uma metanálise (PLOEGER *et al.*, 2009) mostrou que um único exercício aumenta a resposta inflamatória em pacientes com diabetes de delitos tipo I, fibrose cística e doença pulmonar obstrutiva crônica, enquanto que o treinamento de resistência aeróbia foi associada a atenuação do sistema inflamatório sistêmica em pacientes com insuficiência cardíaca crônica e diabetes tipo II, assim a análise do efeito do exercício físico sobre doenças inflamatórias, em particular, devem ser conduzidas em relação com o mecanismo pelo qual os mediadores inflamatórios e os moduladores são produzidos na patologia específica pelo tipo de exercício a ser empregado.(S *et al.*, 2017) .

### 2.3 Micróglia

Antes denominados células gliais, neuróglia ou simplesmente glia, os gliócitos compreendem um conjunto de diferentes células que inicialmente receberam esse nome por acreditarem que sua única função era de sustentação neuronal, além da função primária de proteção neuronal, os gliócitos são fonte de energia e precursores neuroquímicos aos neurônios, regulam a concentração iônica extracelular e removem restos celulares, ainda têm participação na febre, alterações no sono, distúrbios de aprendizado e memória e em condições de neuro inflamação e neurodegeneração. Os gliócitos correspondem a um conjunto de células distintas, morfológica e funcionalmente, podendo ser divididos em subgrupos cuja denominação está associada às suas dimensões: micróglia e astrócitos.

A interação entre micróglia e astrócitos é consistente com os mecanismos de desenvolvimento da dor neuropática descritos na literatura, sugerindo que a micróglia é o primeiro tipo celular a ser ativado no SNC e esta ativação conduz ao recrutamento de astrócitos vizinhos, essas interações e funções desses dois tipos celulares representam o ponto chave na fisiopatologia da dor neuropática, ativação glial é necessária e suficiente para desencadear as alterações relacionadas ao comportamento nociceptivo, agindo tanto na criação quanto na manutenção da dor.

### 2.4 Ação do exercício físico na microglia e bdnf.

O exercício físico tem um papel importante como modulador da atividade glial, a atividade micróglia no sistema nervoso central depende da presença de purinas, citocinas, quimiocinas e podem induzir a sua ativação e estimular a função protetora ou tóxica após lesões periféricas e centrais. Este aumento é dependente da atividade do ATP interagindo com os receptores purinérgicos P2, que demonstra ser um crítico evento induzindo a ativação de células micróglia e gerando inflamação patológica e estados dolorosos. (S *et al.*, 2017).

Após a lesão o BDNF desempenha o importante papel, induz a hiper excitabilidade do sistema nociceptivo e tem relação com uma menor expressão do cloreto de potássio 2 (KCC2) que é uma proteína co-transportadora de neurônio específica que tem a capacidade de diminuir a concentração do íon cloreto dentro da célula, sendo essencial para resposta inibitória ao GABA no sistema nervoso em ação excitatória e não excitatória o efeito é geral é excitabilidade aumentada de neurônios centrais acarretando em uma neuro toxicidade e ampliação dos estímulos de dor. Neste ambiente patológico o treinamento físico, específico para tal patologia, demonstra ser uma ferramenta eficaz na redução e prevenção da atividade micróglia e inflamação associada a mecanismos da neuropatia (COULL *et al.*, 2005; FERRINI; KONINCK, 2013)

A regulação negativa do KCC2 (Co transportador de cloreto de potássio 2) é uma



consequência do aumento do Trkb receptor de BDNF que suprime a inibição do neurônios gabaérgicos, consequentemente a lesão periférica, esta reação se torna responsável pela inversão de fluxo de ânions de inibitório para excitatório pela ativação de receptores GABA no corno dorsal devido a despolarização aferente ao contrário do que foi já foi mostrado , após o exercício a expressão de BDNF é significativamente reduzido após o incremento da intensidade no exercício, sugerindo que o aumento da intensidade do exercício pode resgatar o KCC2 alterando a atividade da micróglia e cessando a excitação do BDNF central .(BEGGS; TRANG; SALTER, 2012; TRANG; BEGGS; SALTER, 2012; TJ; F; Y., 2005) o exercício físico pode reduzir a atividade micróglia central e processos transcricionais que começam a partir da atividade do músculo esquelético, no entanto, é dependente da intensidade e tipo de exercício.

Embora seja frequentemente sugerido que “o exercício é medicina”(Jonas S, 2009) , quantificar a carga de treinamento ou exercício físico é essencial para estabelecer e prescrever protocolos de treinameto adequados para indivíduos com doenças crônicas. Entretanto, o conhecimento dos mecanismos através dos quaiexoexercício físico de longa duração promove as alterações no sistema nervoso para que ocorra uma recuperação funcional representa um dos principais fatores limitantes para a implementação efetiva da atividade física como instrumento terapêutico em diversas doenças.

## 2.5 Carga de treinamento

O processo de treinamento pode ser resumido em alterações de parâmetros fisiológicos decorrentes de uma carga de treinamento pode ser o qual pode ser definido como estresse fisiológico imposto ao corpo do indivíduo por uma determinada carga de treinamento, ou seja, a adaptação ao estímulo ou carga de treinamento que pode vir a ser negativa ou positiva, é dependente do tipo e a intensidade do estímulo prescrito. Até recentemente a prescrição era feito de maneira muito intuitiva fazendo com que a experiencia de quem prescrevesse fosse de extrema importância, intuição essa que não pode acontecer em casos especiais como em patologias ou enfermidades pois o risco de ao invés de melhorar pode piorar e em alguns casos levar até a morte como é o caso de patologias cardíacas, por exemplo. Diante da importância do controle e da prescrição do treinamento é imprescindível que haja ferramentas de qualidade para que haja o controle e prescrição de qualidade (Hamilton ROSCHEL et al., 2011) .

para compreendermos melhor a componente carga de treinamento devemos entender que tudo inicia com o trabalho muscular que é exigido no potencial de treinamento e que pode ser controlado pela condição que o indivíduo apresenta no momento de execução do exercício, o qual produz um efeito de treinamento que leva a um processo de adaptação (Zakharov; Gomes, 2002).

A adaptação acontece somente quando o estímulo empregado provoca um estresse ótimo para o organismo do indivíduo, sendo assim o resultado de um ajuste de carga onde estímulo relativo a carga de treinamento empregado esteja equilibrada com o tempo de recuperação. As cargas de treinamento visam consolidar ou manter os níveis de aptidão do indivíduo, conhecer os componentes que compõem a carga é fundamental para se encontrar o ajuste ótimo, os componentes da carga de treinamento podem ser divididos em: volume, intensidade, descanso.

O volume constitui um elemento quantitativo da carga aplicada, se refere a quantidade de atividade a se realizar que pode ser chamada de distância, tempo e repetições.

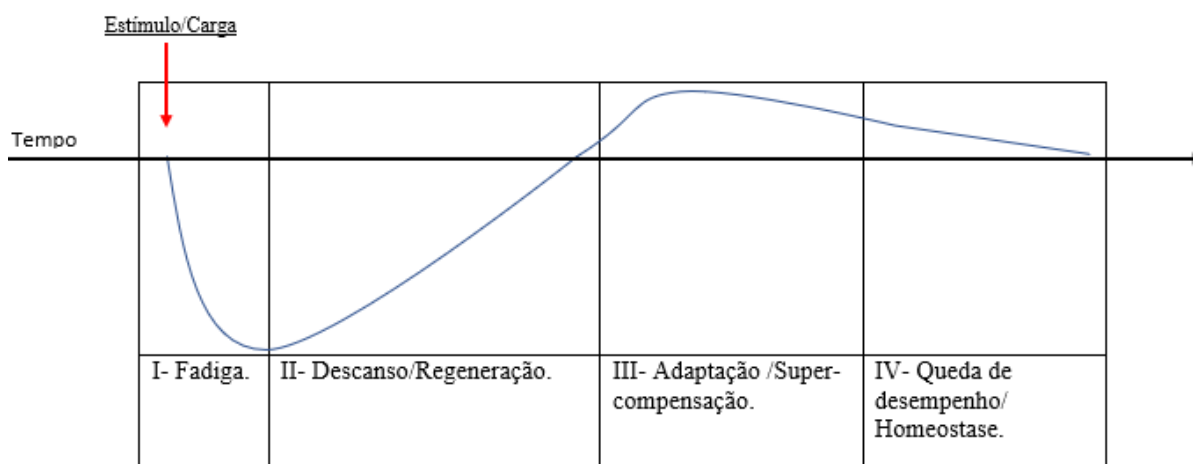
A intensidade se refere ao aspecto qualitativo da carga, relacionado ao esforço despendido para realizar determinado volume de treino.

Descanso é o componente interno da carga que constitui um meio de dose-resposta, ou seja, para otimizar os efeitos do exercício físico, pois se o descanso for um tempo muito curto pode levar ao aumento da fadiga e se for muito longo pode levar a atrapalhar o rendimento.

A adaptação interna referente a estímulos de carga externa que é organizado sistematicamente e que promove o ciclo de super-compensação fig onde a adaptação pode ser dividida em fases:

- Fase I: após aplicação de carga de estímulo o organismo experimenta a fadiga.
- Fase II: recuperação acima do nível normal das reservas energéticas.
- Fase III: recuperação por completo, super-compensação.
- Fase IV: período ótimo para um novo estímulo, caso contrário ocorrerá a chamada involução, queda de desempenho.

**Figura 2 – fenômeno da supercompensação**



Ou seja, o processo de adaptação é relativo ao estímulo empregado, intensidade do estímulo e tempo ideal de descanso que provera a regeneração e consequentemente a super-

compensação.

## 2.6 Quantificação de carga

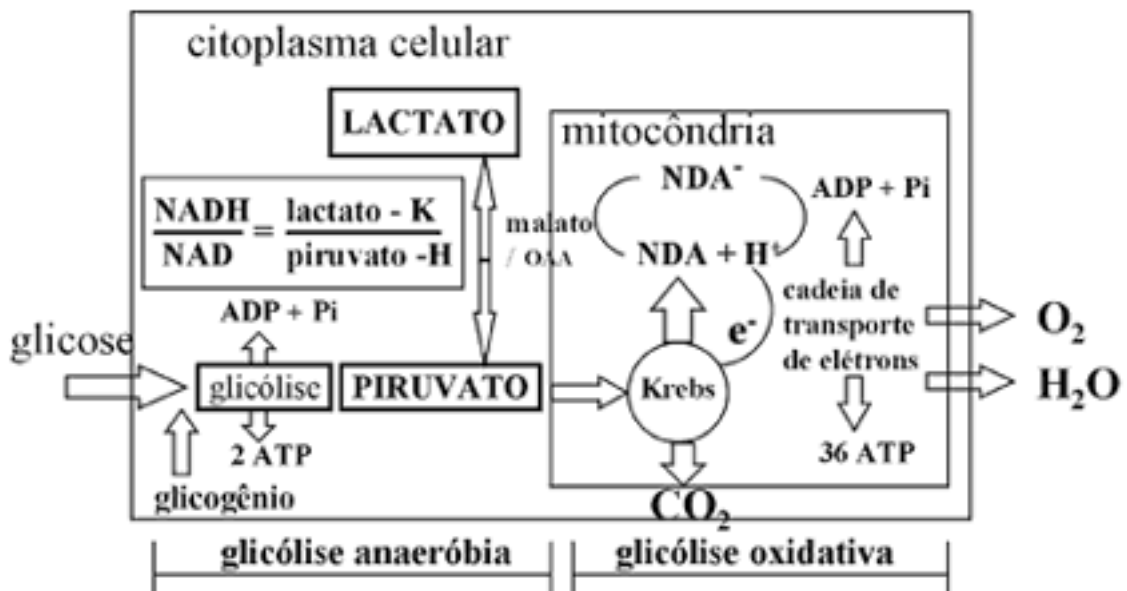
Visando a busca de um treinamento mais individualizado buscam-se meios de avaliar a aptidão física para a prescrição de um treinamento mais fidedigno com isso, diversos protocolos estão sendo utilizados para a determinação das variáveis fisiológicas, para identificar um padrão ideal de treinamento para cada indivíduo ou adquirir parâmetro, médias para um grupo específico de indivíduos, de características patológicas por exemplo, logo, parâmetros aeróbios e anaeróbios são de extrema importância para prescrição do treinamento, parâmetros como o máximo consumo de oxigênio (VO<sub>2</sub>MAX), e o limiar anaeróbio (LAN).

O LAN pode ser determinado utilizando-se concentrações de lactato sanguíneo e representa a máxima intensidade onde ocorre um equilíbrio entre a produção e remoção do lactato. (ANTUNES NETO, 2012)

### 3 Lactato

O lactato é o produto do metabolismo de carboidratos (figura 2) e pode ser encontrado na musculatura, no sangue e em vários órgãos, sendo produzido normalmente pelos músculos esqueléticos, intestino, cérebro e eritrócitos. O fígado e uma pequena porção dos rins são responsáveis pelo seu metabolismo, pode ser armazenada no fígado e nos tecidos musculares sob forma de glicogênio conforme a quebra do glicogênio resulta na formação do piruvato, que poderá seguir cinco caminhos diferentes: lipogênese, oxidação via ciclo de Krebs, formação de alanina, gliconeogênese ou pode ser convertido em lactato. (CAPUTO *et al.*, 2009; MARQUEZI, 2006; APLICACOESFISIOEX...; WWW.MMCUIDADOSINTENSIVOS.CO.CC, )

Figura 3 – Metabolismo da glicose no tecido cerebral.



$H^+$ , ion hidrogênio ativo; Pi, fosfato inorgânico; NADH, NAD<sup>+</sup>, nicotinamida adenosina dinucleotídeo reduzida e oxidada; OAA, ácido oxalacético;  $e^-$ , elétron.

Arq Neuropsiquiatr. 2000;58(3-A)

#### 3.1 Dinâmica do lactato no incremento da carga

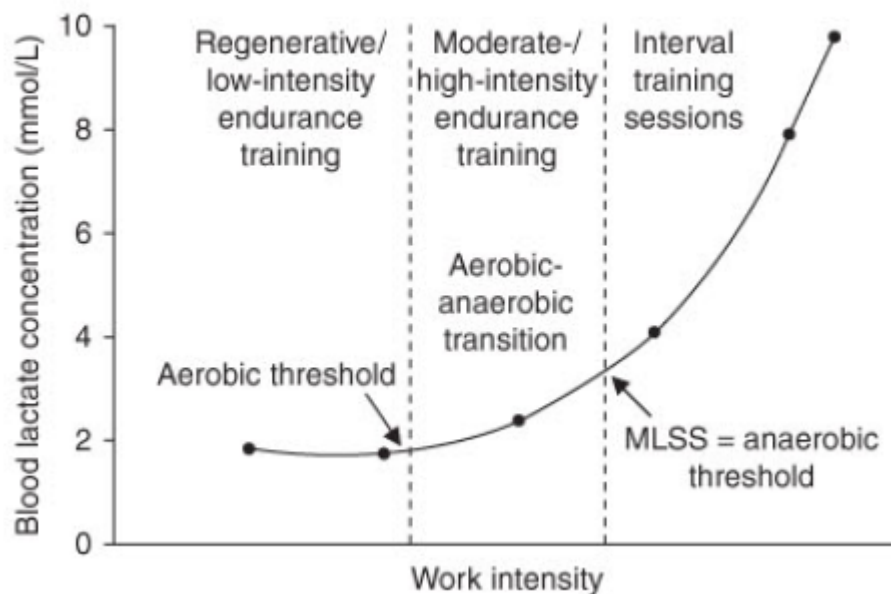
Carboidratos e lipídeos são usados como substratos energéticos durante o repouso, no exercício a contribuição relativa de cada substrato para a demanda energética é determinada pela intensidade do exercício, duração, esforço, treinamento, dieta e ação hormonal.

Nas fases iniciais do exercício com a intensidade progressiva a demanda energética é suprida por mecanismos oxidativos, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa, através da degradação preferencial de ácidos graxos, a produção de energia por este mecanismo é dependente da contínua conversão de glicogênio.

Com o aumento da intensidade do exercício, entre 40 e 75 % do VO<sub>2</sub>Max, na máxima fase estável do lactato, a oxidação de ácidos graxos em relação à oxidação de glicogênio diminui progressivamente, inibida principalmente pelo maior fluxo de substratos através da via glicogenolítica/glicolítica e aumento da atividade da enzima piruvato desidrogenase.

Após a transição exercício moderado para intenso acima de 75% do VO<sub>2</sub>max, acima do limiar anaeróbio a demanda energética passa a ser suprida predominantemente pela glicogenólise hepática/muscular e glicólise muscular com subsequente acúmulo muscular e sanguíneo de lactato e íons H<sup>+</sup> (figura 3). (CAPUTO *et al.*, 2009; Ó; W; T, 2010)

Figura 4 – Dinâmica do lactato nas transições de gases metabólicos



(Faude ó et al., 2010)

Logo, a resposta do lactato sanguíneo em resposta à intensidade do exercício e sua relação com a transição aeróbia e anaeróbia delimitando limiares energéticos, demonstra ser uma boa ferramenta para quantificar a capacidade aeróbia do indivíduo para uma posterior prescrição de treino e assim controlar a intensidade do exercício a mais próxima possível do limite e objetivos do indivíduo, ou seja, o lactato é um bom marcador de intensidade.

#### 4 Máxima fase estável de lactato (MFEL)

A máxima fase estável de lactato(MFEL) , é o método padrão ouro para se identificar o limiar anaeróbio ou limiar de lactato que é a maior intensidade onde a concentração de lactato sanguíneo se mantenha estável durante uma carga de trabalho constante submáxima e prolongada. 3,5 a 4µl é concentração fixa de lactato encontrada Na maioria dos indivíduos nesta intensidade, no entanto, valores podem variar de 3 a 5,5 µl para alguns indivíduos.(HECK *et al.*, 1985; BENEKE, 2003).

Normalmente é detectada em 30 minutos de exercício contínuo onde na intensidade onde a concentração de lactato sanguíneo não ultrapasse mais de 1 mmol entre o décimo e o trigésimo minuto .

A máxima fase estável é importante por ser um grande marcador para capacidade de endurance por atletas de elite e intermediário, indivíduos treinados ou não e é considerado por muitos um preditor de performance pois é considerada a máxima intensidade de exercício que se pode realizar ao longo do tempo, sessenta minutos, o quadro abaixo demonstro que a máxima fase estável do lactato pode diferir em alguns parametros como a concentração do lactato correspondente a mfel a carga de trabalho e a carga máxima de trabalho são diferentes, no entanto a a intensidade relativa a mfel foram semelhantes o os dados sugerem que a modicidade esportiva influenciam a carga de trabalho(BENEKE; DUVILLARD, 1996) possivelmente devido a especificidade muscular de cada modalidade, programas de treinamento e padrão motor para o ciclismo,remo e patinação de velocidade , daí a necessidade de se ter um protocolo de teste específico para cada modalidade.

**Tabela 1 – Determinação da resposta máxima do estado estável de lactato em eventos esportivos selecionados.**

	Remo	Ciclismo	Patinação de velocidade	Significancia
MFEL (mmol.l <sup>-1</sup> )	3.1 ± 0.5	5.4 ± 1.0	6.6 ± 0.9	$p \leq 0.001$
Carga de trabalho MFEL (w)	316.2 ± 29.9	257.8 ± 34.6	300.5 ± 43.8	$p \leq 0.01$
Maxima carga de trabalho relativa a MFEL (w)	416.8 ± 46.2	358.6 ± 34.4	383.5 ± 40.9	$P \leq 0.01$
Intensidade da MFEL (%)	76.2 ± 5.7	71.8 ± 5.9	78.1 ± 4.4	NS

Adaptado de Beneke,1996.

Na ânsia de determinar as causas da fadiga e assim proporcionar testes e protocolos de treinamento para melhora da performance(BARON *et al.*, 2008; NOAKES; GIBSON; LAM-

BERT, 2004) determinaram que na intensidade da máxima fase estável do lactato, mesmo com vários fatores estabilizados naquela intensidade o indivíduo chegava em fadiga em até 60 min, acredita-se que a causa da fadiga seja feita pela integração do sistema central e periférico e consequentemente um aumento da percepção de esforço, no entanto durante a mfel vários fatores estabilizam e acompanham a dinâmica do lactato o que proporciona a novas possibilidades de se determinar a mfel, possibilidades essas mais vantajosas no sentido econômico e de praticidade, logo, métodos indiretos de se determinar a mfel foram e são propostos a fim de viabilizar novas vias de prescrição e controle do treinamento.

#### 4.1 Métodos indiretos

O limiar de lactato pode ser obtido durante um teste incremental e presume-se que seja a carga de trabalho correspondente a máxima fase estável do lactato (MFEL), logo, ele pode ser identificado por vários métodos como ...

Nos métodos indiretos são avaliadas as variações fisiológicas que ocorrem na mesma intensidade da máxima fase estável do lactato e são comparadas ao teste original de máxima fase estável para se obter fidedignidade nos resultados e podem ser divididos em invasivos ou não, testes como lactato mínimo, parâmetros respiratórios, percepção subjetiva do esforço (PSE) e frequência cardíaca.

##### Limiar ventilatório (LV)

Estudos com limiar ventilatório (LV) é identificado pelas mudanças da ventilação pulmonar e dos equivalentes ventilatórios de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> os critérios adotados para identificação dos limiares ventilatórios eram os pontos de quebra da VE (Volume de ar expirado por minuto Ventilação Minuto (VE)) em relação ao volume máximo de oxigênio (VO<sup>2max</sup>) foi sugerido o uso de outras variáveis como VE/VO<sub>2</sub>, VE/VCO<sub>2</sub> Basicamente, o que se procura identificar durante um protocolo incremental de cargas é o momento em que ocorre um aumento do VE/VO<sub>2</sub> e da pressão de oxigênio (O<sub>2</sub>), sem alterações no VE/VCO<sub>2</sub> e na pressão de CO<sub>2</sub>, em relação ao limiar ventilatório, a literatura tem mostrado que pode ser considerada um indicador de identificação da intensidade relacionada a máxima fase estável do lactato (Mfel).

##### Limiar anaeróbio individual (IAT)

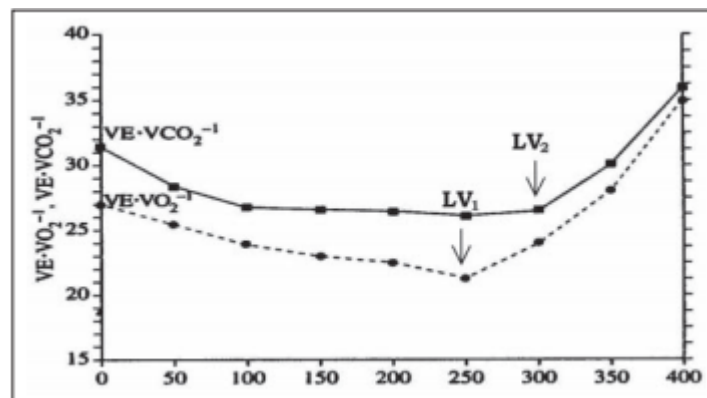
O IAT é definido como a mais alta taxa metabólica em que a concentração do lactato sanguíneo é mantida em estado de equilíbrio durante exercício prolongado e é capaz de determinar a intensidade correspondente a máxima MFEL

Em um grupo de oito ciclistas de níveis paulista e nacional (idade: 27,88 ± 8,77 anos; massa corporal: 65,19 ± 4,40kg; estatura: 169,31 ± 5,77cm) com o objetivo de correlacionar as intensidades relacionadas ao limiar anaeróbio individual (IAT) determinação do limiar

ventilatório (LV) .

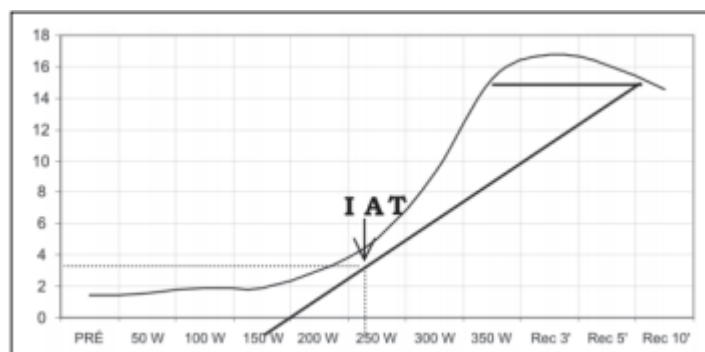
As intensidades obtidas nos protocolos de determinação do IAT e do LV2 deveriam coincidir e foi o que aconteceu, como pode ser visto nas figuras 5 e 6 . Os resultados deste estudo demonstraram que sim existe a possibilidade de se utilizar estes testes para se encontrar o limiar de lactato. Embora a intensidade do LV2 seja 3,8% superior em relação à do IAT, pode-se considerar que o protocolo do IAT é capaz de determinar a intensidade correspondente a máxima fase estável do lactato(mfel).(OKANO *et al.*, 2006)

Figura 5 – Intensidade relacionada ao LV1 e LV2 de acordo com VE/VO2 e VE/VCO2



Okano et al. 2006.

Figura 6 – Intensidade relacionada ao limiar anaeróbio individual (IAT)



Okano et al. 2006.

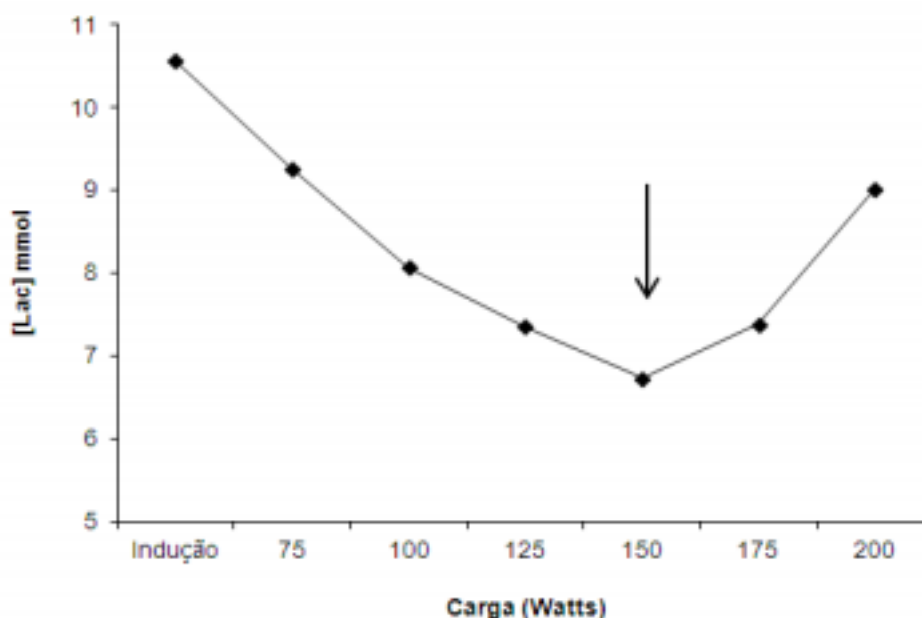
Lactato mínimo



O teste do lactato mínimo utiliza um único teste de intensidade incremental para identificar a maior intensidade de exercício em que ocorre equilíbrio entre produção e remoção do lactato sanguíneo.

Este protocolo emprega um esforço máximo prévio para indução da hiperlactatemia (altas concentrações de lactato), seguido de um teste incremental até a exaustão após um período de recuperação. A cinética do lactato apresenta um comportamento em forma de “U” durante o incremento de intensidade e a menor concentração de lactato é considerada a intensidade de limiar anaeróbio, ou seja, apresenta a intensidade onde ocorre o equilíbrio entre produção e remoção do lactato sanguíneo. Abaixo na figura 7, pode ser visto o formato de “U” no teste com cargas incrementais logo após um estímulo para elevar a concentração de lactato ao máximo. (MADRID *et al.*, 2012)

Figura 7 – Determinação do protocolo de lactato mínimo.



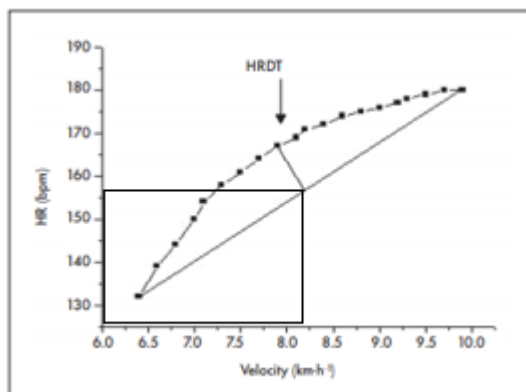
Bibiano Madrid et al.2012.

#### Ponto de deflexão da frequência cardíaca (PDFC)

proposto por (F. *et al.*, 1982) essa técnica tende a ser uma ferramenta confiável e não invasiva de se determinar intensidade da máxima fase estável do lactato, o teste se baseia em um teste incremental de cargas e no ponto de deflexão de curva de frequência cardíaca esta relacionada com a carga empregada na máxima fase estável do lactato, é um teste muito usado por atletas amadores e não atletas como ferramenta de controle de treino, devido a possibilidade de ser feito

fora do laboratório o que é melhor devido a maior similaridade do gesto motor. (PE *et al.*, 2015)

**Figura 8 – Determinação da deflexão da frequência cardíaca**



Adaptado de Pereira PE et al 2015.

A máxima fase estável do lactato como já foi dita anteriormente é conhecido por ser um padrão ouro de qualidade no entanto é uma teste caro e demanda de muitos dias, o que a torna não viável para qualquer população é dependente do ergômetro, sport e grupo a ser utilizado, devido a isto existe a procura de se determinar a intensidade relacionada a mfel é grande, logo, este trabalho tem a finalidade de se estabelecer um protocolo de treino através da máxima fase estável do lactato e possa servir de padrão para futuras adaptações deste protocolo visando um melhor custo benefício uma validação de qualquer teste que se propõe a encontrar o limiar de lactato correspondente a mfel.

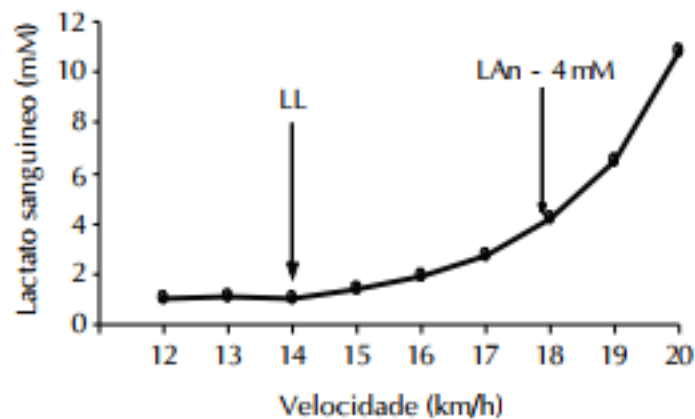
A intensidade de exercício correspondente a MFEL tem predominância do sistema energético aeróbio, Acima dessa intensidade, o predomínio energético se desloca para as vias anaeróbias.

O lactato vem sendo usado como marcador de fisiológico da intensidade do exercício é uma importante ferramenta para controlar a intensidade do exercício aeróbio. Seu acúmulo no sangue reflete um aumento do metabolismo anaeróbio uma diminuição nos mecanismos responsáveis pela remoção do lactato, ocasionando a perda de um estado de equilíbrio no organismo. Dentre uma gama de protocolos e meios para se avaliar a capacidade aeróbia (ZAGATTO *et al.*, 2013)

Para se estabelecer a máxima fase estável do lactato é necessário determinar a dinâmica do lactato, o procedimento para se determinar o ponto exato onde acontece a mfel, é feito através de um teste com carga incremental ( figura 6) onde é feita uma coleta de sangue, poucos segundos antes de aumentar a velocidade que é aumentada a cada intervalo de tempo, a partir daí realizar mais 3 a 5 testes de carga constante ( figura 7) a fim de encontrar a maior intensidade de exercício

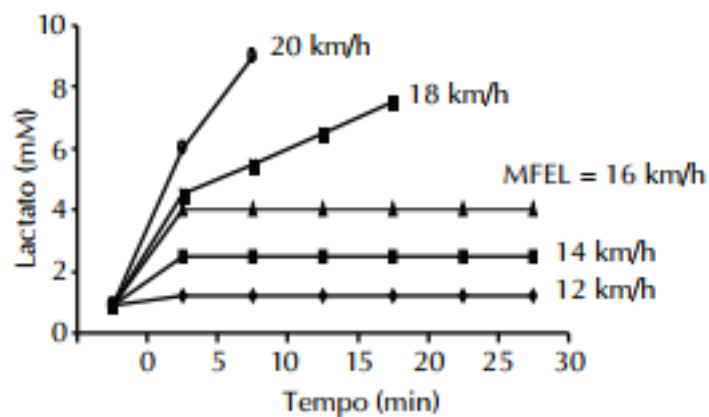
prolongado onde a produção e remoção do lactato se mantenha em equilíbrio.

Gráfico 2 – Comportamento do lactato sanguíneo durante um teste de cargas incrementais para determinação do limiar de lactato (LL) e do limiar anaeróbico (LAn) durante a corrida.



Fabrizio Caputo et al., 2009.

Gráfico 3 – Protocolo de determinação da máxima fase estável de lactato (MFEL) sanguíneo durante a corrida.



Fabrizio Caputo et al., 2009.

Estudos da fisiologia do exercício têm utilizado animais de laboratório para simular as condições de estresse físico frequentemente observado em humanos. A finalidade é o melhor acompanhamento das alterações sistêmicas, celulares e moleculares decorrentes do exercício,

contudo, é necessário que os protocolos de exercícios para animais simulem adequadamente as situações a serem investigadas(JC *et al.*, 2007) .

Pesquisadores nessa área(JC *et al.*, 2007; MOURA; KOKUBUN, 2006; JA *et al.*, 2013; AL *et al.*, 2013) dizem que a natação tem sido muito empregada, pois é uma habilidade inata aos ratos e camundongos e os estudos realizados utilizando esse modelo revelam a ocorrência de adaptações ao treinamento físico semelhante àquelas observadas em humanos. Neste projeto investigaremos a carga ideal de trabalho físico, medida a partir da MFEL de animais sedentários e submetidos a treinamento, para obtenção do melhor efeito antinociceptivo em camundongos com neuropatia periférica após lesão do nervo isquiático.

## **5 Objetivos**

### **5.1 Objetivo geral**

Investigar a intensidade de exercício físico necessária para promover analgesia e o desenvolvimento de alterações crônicas de sensibilidade somática em camundongos com lesão parcial de nervo periférico.

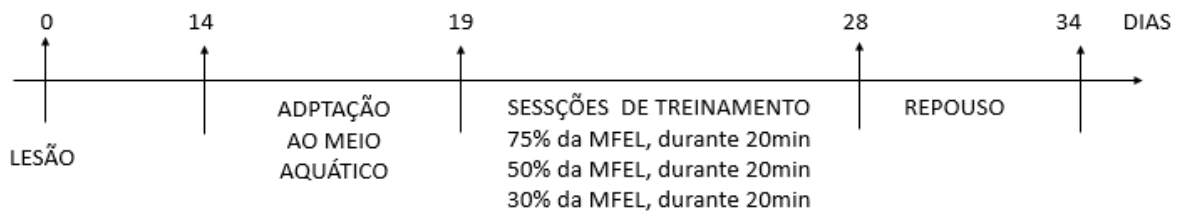
### **5.2 Objetivos específicos**

- 5.2.1 Monitorar a MFEL em camundongos sedentários com lesão parcial ou fictícia do nervo isquiático submetidos à natação.
- 5.2.2 Correlacionar alterações da MFEL com respostas sensoriais provocadas por estímulo mecânico periférico, em camundongos sedentários com lesão parcial ou fictícia do nervo isquiático submetidos à natação.
- 5.2.3 Determinar a menor carga e volume de trabalho físico (natação) capaz de promover a melhor recuperação sensorial em camundongos com neuropatia periférica.
- 5.2.4 Investigar as mudanças fenótipicas, proteicas, do grupo de animais com lesão no nervo e relaciona-las com a melhor resposta nociceptiva.

## 6 Desenho experimental

A figura 8, mostra, de forma esquemática, o desenho experimental deste projeto. Inicialmente os animais serão submetidos a avaliação quanto à resposta ao estímulo mecânico não doloroso e submetidos à lesão parcial ou fictícia do nervo isquiático esquerdo. Quatorze dias após a cirurgia os animais serão monitorados comportamentalmente para avaliação do aparecimento, ou não, de alodinia mecânica. A partir do décimo quinto dia os animais serão submetidos à adaptação a água por três dias. Em seguida serão submetidos à atividade física através da natação com diferentes cargas de treinamento. No vigésimo nono e trigésimo quarto dia, 15 horas após a última sessão de treino, os camundongos serão novamente avaliados em relação à resposta ao estímulo mecânico e, em seguida, submetidos à eutanásia para retirada da coluna dorsal da medula espinal. Animais controle serão submetidos à lesão parcial do nervo isquiático e permanecerão em condições sedentárias por 20 dias, quando serão avaliados comportamentalmente e eutanasiados para extração da coluna dorsal da medula espinal.

**Figura 9 – Desenho experimental.**



## **7 Materiais e Métodos**

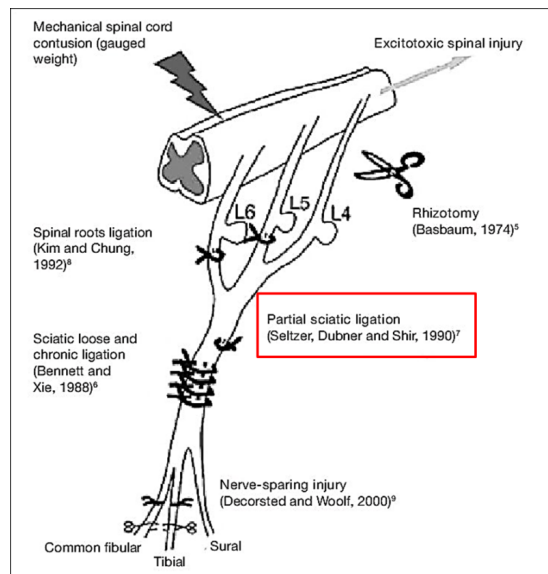
### **7.1 Animais**

Camundongos machos entre 8 e 10 semanas de vida e com peso inicial de 20-23g (linhagem Balb/C) serão mantidos em ambiente com temperatura e luminosidade controlados ( $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , ciclo claro/escuro de 12:12 h) e livre acesso a ração e água. Em cada grupo experimental serão usados oito animais.

### **7.2 Modelo experimental de neuropatia periférica**

O modelo experimental de dor neuropática induzido por lesão de nervo periférico consistirá em ligação parcial e unilateral de nervo periférico (figura 7)([AB; AI, 1998](#); [SELTZER; DUBNER; SHIR, 1990](#)). Após anestesia com uma associação de cloridrato de ketamina (40 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg) por via intramuscular, o nervo isquiático esquerdo será exposto na região glútea e aproximadamente metade do nervo será fortemente ligado com fio de sutura de algodão não absorvível 8-0. A musculatura sobre o nervo será suturada e a pele fechada com grampo metálico. Este modelo determina uma síndrome com sinais de aumento da sensibilidade somática a estímulos não nociceptivos (para este fenômeno será usado o termo ‘alodínia’, seguindo uso comum na literatura internacional) e nociceptivos, que clinicamente caracterizam a hiperalgesia. Estes sinais se iniciam 24-48 horas após a lesão do nervo periférico, perdurando por um período de até três meses. Animais com lesão fictícia serão submetidos somente à abertura da pele e da musculatura sobre o nervo isquiático.

**Figura 10 – Nervo isquiático com ligadura parcial de 1/3 a 1/2 do nervo isquiático modelo de (SELTZER; DUBNER; SHIR, 1990) .**



Shannon DShilelds et al.,2003. adaptado de (Ze'ev Seltzer et al. (1990))

### 7.3 Teste algesimétrico

Serão realizados testes de sensibilidade mecânica para monitoramento de alodínia, um conjunto de nove filamentos (filamentos de Von Frey) será aplicado na superfície plantar esquerda de cada animal em ordem crescente de força (de 1,62 a 35,59 microNewton) .

O limiar de retirada da pata será determinado pelo aumento ou diminuição sequencial da força de cada estímulo e calculado pelo teste não-paramétrico de Dixon<sup>24</sup>.

A resposta flexora ao estímulo mecânico será monitorada antes da eutanásia e somente os animais com alodínia/hipersensibilidade mecânica participarão dos experimentos.

A comparação entre diferentes grupos será feita pelo teste não-paramétrico de Friedman. As diferenças serão consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

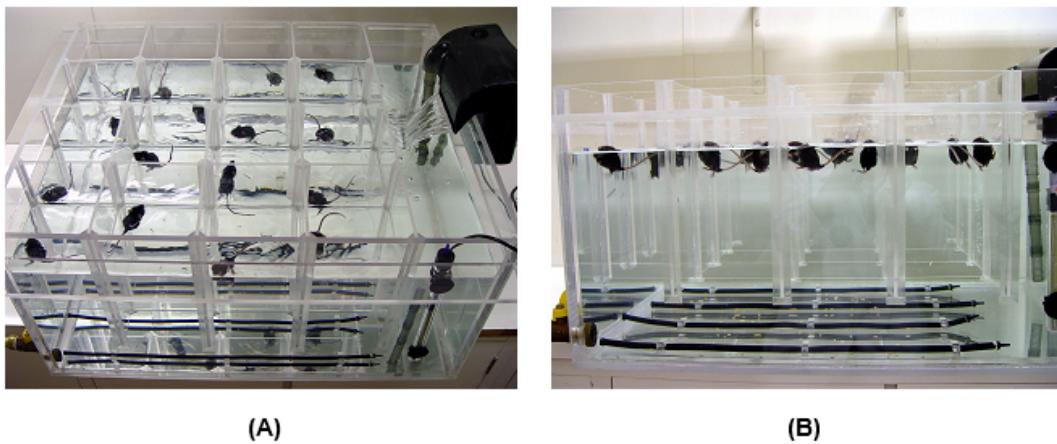
### 7.4 Exercício físico

A atividade física consistirá de sessões de natação em tanque de acrílico com água aquecida a  $32^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . As sessões de natação ocorrerão entre 22 e 23h e neste tanque cada animal ocupará, individualmente, uma área de 15 cm<sup>2</sup> e com 30 cm de profundidade, a fim de



se prevenir que os animais boiem, bolhas de água serão produzidas por tubos fixados no fundo do tanque e conectados, externamente, à bomba de ar. Durante as sessões de treinamento, será usado um filtro de água com fluxo de 380 l/h para manter a água do tanque limpa.

**Figura 11 – Visão superior (A) e lateral (B) do tanque de treinamento para camundongos.**



## 7.5 Grupos experimentais

Três dias antes treinamento físico, os animais serão aclimatados em sessões diárias no exercício que realizarão. Estas sessões terão a duração de três minutos e visam reduzir o estresse associado ao ambiente de treinamento e à manipulação dos animais. Todos os grupos experimentais iniciarão o treinamento físico sistemático a partir do 14º dias após a lesão parcial do nervo isquiático ou, no caso do grupo controle, a lesão fictícia do nervo. No 14º dia após a lesão, serão realizados testes de sensibilidade somática para confirmação e monitoramento do estabelecimento de alodínia mecânica. Os animais com lesão do nervo periférico e os não lesados serão, aleatoriamente, submetidos aos seguintes protocolos experimentais (Tabela 2)

Tabela 2 – Protocolo Experimental

		Grupo sedentário	Grupo submetido a treinamento
Determinação da máxima fase estável de lactato (MFEL)	Animais intactos	8	8
	Animais com lesão fictícia	8	8
	Animais com lesão parcial do nervo isquiático	8	8
Determinação de 75% da MFEL	Animais intactos	8	8
	Animais com lesão fictícia	8	8
	Animais com lesão parcial do nervo isquiático	8	8
Determinação de 50% da MFEL	Animais intactos	8	8
	Animais com lesão fictícia	8	8
	Animais com lesão parcial do nervo isquiático	8	8
Determinação de 30% da MFEL	Animais intactos	8	8
	Animais com lesão fictícia	8	8
	Animais com lesão parcial do nervo isquiático	8	8
Total de animais: 192			

## 7.6 Determinação da Máxima Fase Estável de Lactato

Inicialmente, todos os animais serão adaptados ao meio líquido por dez minutos durante três dias. Em seguida, os animais serão divididos em três grupos: lesão parcial do nervo isquiático, lesão fictícia do nervo isquiático e grupo controle de nado (animais intactos, sem lesão). Cada grupo será constituído por oito camundongos. Todos os animais serão submetidos ao protocolo de teste de lactato para a determinação da máxima fase estável que será realizado de acordo com procedimento descrito por Gobatto *et al.* (CA *et al.*, 2001) com diferença nas cargas empregadas. O teste consistirá em um teste de natação com carga incremental de até a fadiga do animal 20 minutos de natação com coleta sanguínea de 10 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) a cada cinco minutos para determinação da curva de lactato de cada animal, suportando cada uma das sobrecargas. Cada animal será submetido a quatro testes, com intervalo de 48h entre eles, de forma que todos serão avaliados suportando todas as cargas. A variação máxima na lactacidemia aceita para a identificação da máxima fase estável será 1,0 mmol/l.

## 7.7 Protocolos de treinamento

Baseado nos resultados do teste de máxima fase estável de lactato, serão realizados três protocolos de treinamento com volume iguais, porém com intensidades de 50 (n = 8), 75 (n = 8) e 100% (n = 8) da máxima fase estável de lactato. O volume de trabalho consistirá em cinco sessões de natação com sobrecarga, durante 20 minutos. O intervalo de descanso entre as sessões será de 48h.

Protocolo 1 (P1): cinco sessões de natação, com 75% da MFEL, durante 20min.

Protocolo 2 (P2): cinco sessões de natação, com 50% da MFEL, durante 20min.

Protocolo 3 (P3): cinco sessões de natação, com 30% da MFEL, durante 20min.

### 7.8 Imunodeteção de proteínas na coluna dorsal da medula espinal.

Para a imunodeteção de astrócitos e micróglia serão obtidos extratos proteicos totais da coluna dorsal da medula espinal lombar (L4-L6) e homogeneizados em tampão contendo 137 mMolar NaCl, 20 mMolar Tris, pH 8,0, 1% de NP-40, 0,105% de SDS, 10% de glicerol e inibidores de proteases (PMSF, aprotinina e leupeptina) e de fosfatases (NaF e Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>). Após homogeneização, os tecidos serão mantidos a 4°C por 20 minutos e centrifugados a 13.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante e o precipitado serão separados e a quantidade de proteína total será determinada pelo método de Lowry em cada uma das amostras. Amostras contendo 0,5 mg de proteína total serão submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo 7.5 - 12% SDS (SDS-PAGE) e transferidas eletricamente para membrana de PVDF. A detecção das proteínas no citosol será feita por incubações sequenciais do anticorpo primário e do secundário seguidas pela revelação através do método de quimioluminescência. Anticorpos anti-GFAP e anti-Iba-1 serão usados para a análise da expressão de astrócito e micróglia, respectivamente. Os filtros serão quantificados por análise de imagem. Serão usados 8 animais para cada grupo experimental e a análise estatística será feita por análise de variância (one-way ANOVA) seguido pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas. As diferenças serão consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

### 7.9 Análise Estatística

Todos os dados serão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Os dados serão analisados através da análise de variância (ANOVA) para dois fatores (múltiplos grupos X tempo). O post-hoc utilizado será o teste de Bonferroni para comparações múltiplas. O teste *t* de Student será aplicado para comparação entre dois grupos. Em todas as avaliações o nível de significância considerado será de  $p < 0,05$  (GraphPad Prism 5.0 software, San Diego, CA).

### 7.10 Aspectos éticos sobre o uso de animais de experimentação

Os protocolos experimentais descritos neste processo seguem as normas de conduta ética com animais de experimentação propostas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. O uso de animais neste trabalho é imprescindível por não existirem métodos alternativos, como modelos matemáticos, simulações computadorizadas ou sistemas biológicos *in vitro* que reproduzam a complexidade dos fenômenos biológicos e fisiopatológicos a serem investigados.

## 8 Resultados e discussão

### 8.1 Teste de máxima fase estável do lactato para os grupos experimentais de neuropatia periférica.

Foi determinada a máxima fase estável do lactato para o modelo de dor neuropática, onde os grupos apresentaram uma concentração de 3,25 % do peso corporal com concentração de 2,14 mmol/l para o grupo de animais intactos (fig.12).

Concentração de 1,91 mmol/L de lactato sanguíneo e as intensidade de 3,15 % do peso corporal e 2,14 mmol/l de concentração lactato para o grupo de lesão fictícia (fig.13).

Concentração de 1,88 mmol/L de lactato sanguíneo, à intensidade de 2,75 % do peso corporal para o grupo de lesão parcial do nervo isquiático (Fig.14).

Corroborando com a ideia de se especificar um protocolo para cada modelo experimental os achados de (MANCHADO *et al.*, 2006) mostraram intensidades de 6 % do peso corporal para mfl e 5,5 mmol/l de concentração de lactato, não apresentando diferenças em valores relativos apenas na relação do peso corporal para animais intactos, e 3,82 mmol/l na concentração lactato em 25  $\mu$ l contra uma concentração de 1,88 para os animais lesados(SABATIER *et al.*, 2011) não demonstrando diferenças na concentração fixa de lactato provando ser um possível método para se a prescrição de treinamento, reafirmando a importância de se definir um protocolo de treino específico para cada modelo de experimentação animal.

Figura 12 – Grupos de animais intactos (controle) .A - Comportamento da curva de lactato no teste incremental . B - Máxima fase estável do lactato correspondente a 3,25 % do peso corporal .

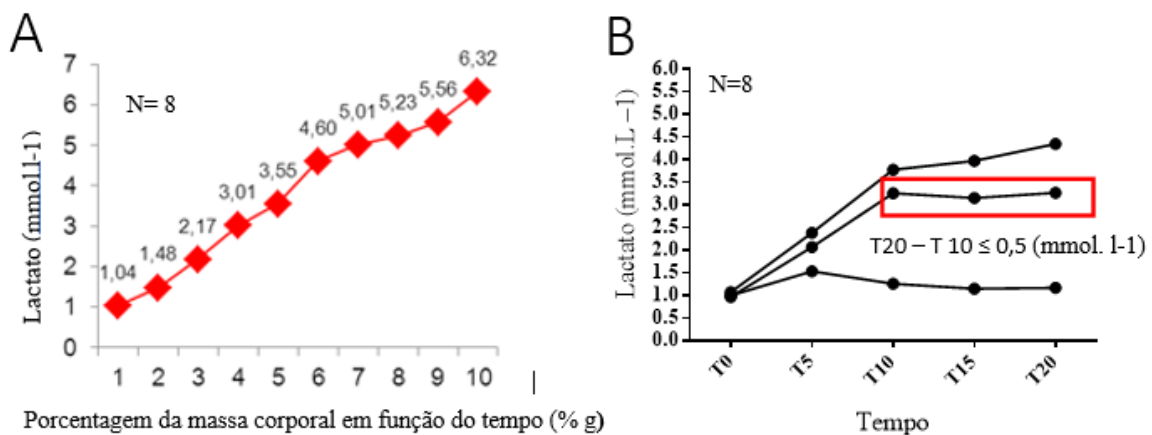


Figura 13 – Grupos de animais Lesão fictícia .B- Comportamento da curva de lactato no teste incremental . B - Máxima fase estável do lactato correspondente a 3,15 % do peso corporal .

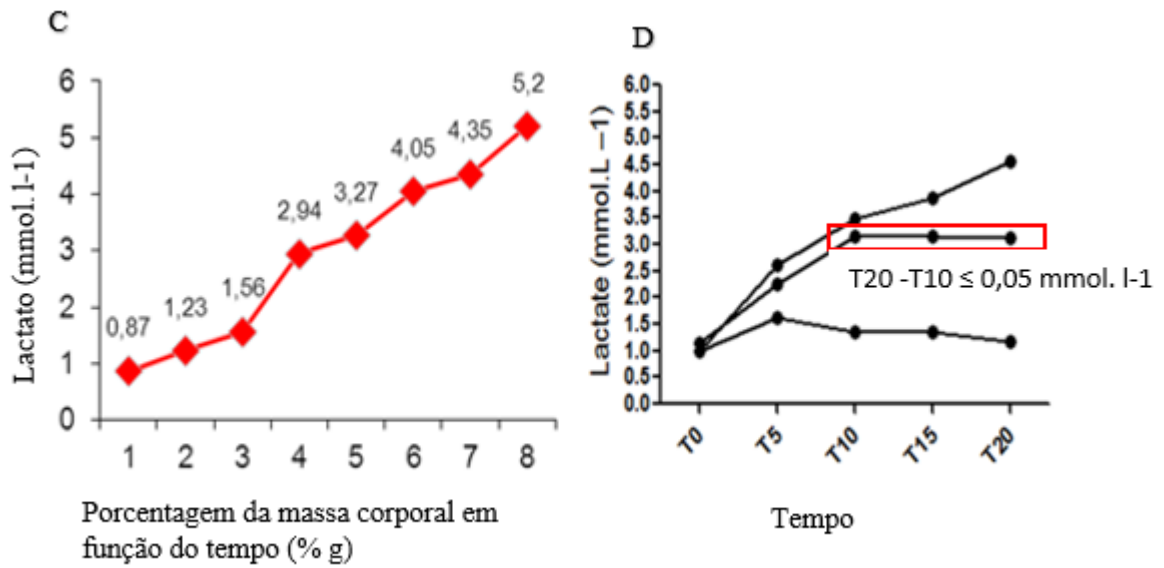
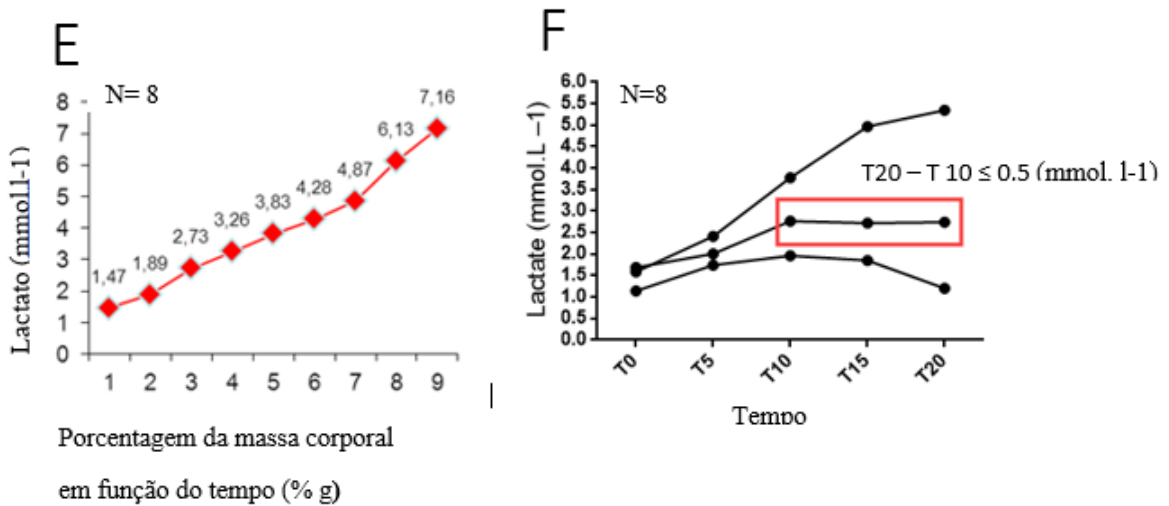


Figura 14 – Grupos lesão parcial do nervo isquiático. E- - Comportamento da curva de lactato no teste incremental . F- Máxima fase estável do lactato correspondente a 2,75 % do peso corporal .

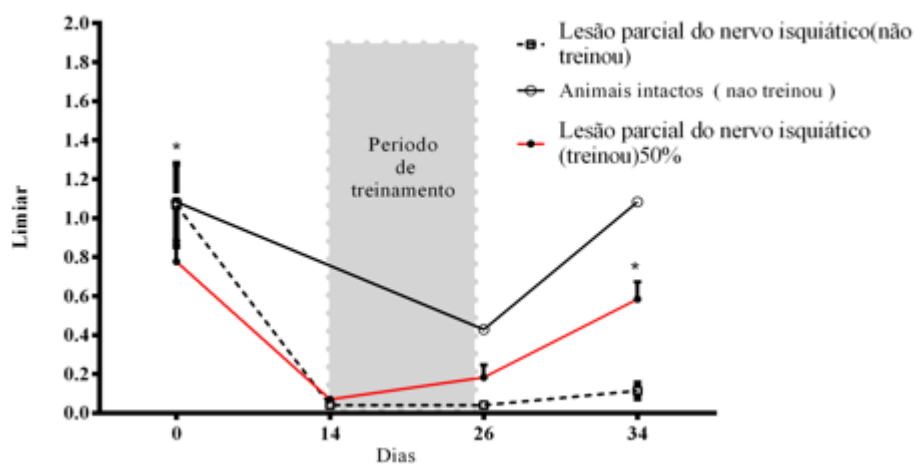


**Figura 15 – Concentração de lactato(lactacidemia) e identificação da máxima fase estavel (MFEL).**

Grupos	Mfel	Lactacidemia
Lesão parcial do nervo isquiático	2,75	1,88
Lesão fictícia	3,15	1,91
Animais intactos(controle)	3,25	2,14

## 8.2 teste algesímetro

De acordo com o teste de sensibilidade mecânica(fig.16) a menor carga de exercício físico capaz de promover a melhor resposta nociceptiva em camundongos com neuropatia periférica foi de 50% da MFEL, achados de (SABATIER *et al.*, 2011) obtiveram reversão da sensibilidade mecânica, no entanto, o modelo era de esmagamento do nervo proposto por (M.BRIDGE *et al.*, 1994) e o protocolo era de 30min e não de 20 como aqui proposto e com intensidades de 75% da mfel. o diferencial é que o presente trabalho apresenta um protocolo com menos intensidade e menor tempo e em um ambiente aquático que também apresenta a reversão da alodinea mecânica.

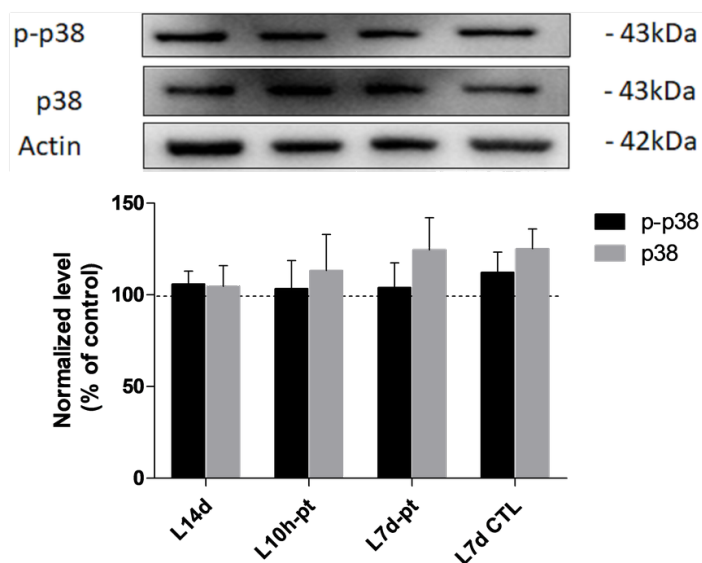
**Figura 16 – Teste algesimétrico**

Os animais lesionados que treinaram obtiveram diferença para os animais que lesionados que não nadaram. Os valores representam media e desvio padrão para n: 8 a 10 animais/grupo, ANOVA para dois fatores \*  $p < 0.001$ , #  $p < 0.01$ .

### 8.3 A atividade física não influencia a expressão e fosforilação de p38MAPK na coluna dorsal da medula espinal após lesão mecânica de nervo periférico.

Quatorze dias após a lesão parcial do nervo isquiático, a expressão de p38MAPK e de sua forma fosforilada não foi alterada (Fig. 17). Da mesma forma, os protocolos de atividade física também não alteraram a expressão destas proteínas.

Figura 17 – Efeito da atividade física sobre a expressão de p38MAPK e da sua forma fosforilada após lesão de nervo periférico.



A lesão de nervo isquiático não provocou um aumento significativo na expressão de p38MAPK (marcador de microglia) na coluna dorsal da medula espinal após 14 dias da lesão. Também não foi observado aumento na forma fosforilada de p38. Painel superior mostra um ensaio sequencial de Western blot com anticorpo anti-p38 e anti-fosfo-p38. O anticorpo anti- $\beta$ -Actina foi usado para controle de quantificação de amostras. Painel inferior: quantificação dos níveis de  $\beta$ -Actina nos diferentes grupos. Os dados são apresentados como a média  $\pm$  EPM da porcentagem da razão entre a quantificação de p38 (barra cinza) ou fosfo-p38 (barra preta) e  $\beta$ -Actina encontrada nos animais submetidos à cirurgia fictícia que é considerada como 100%

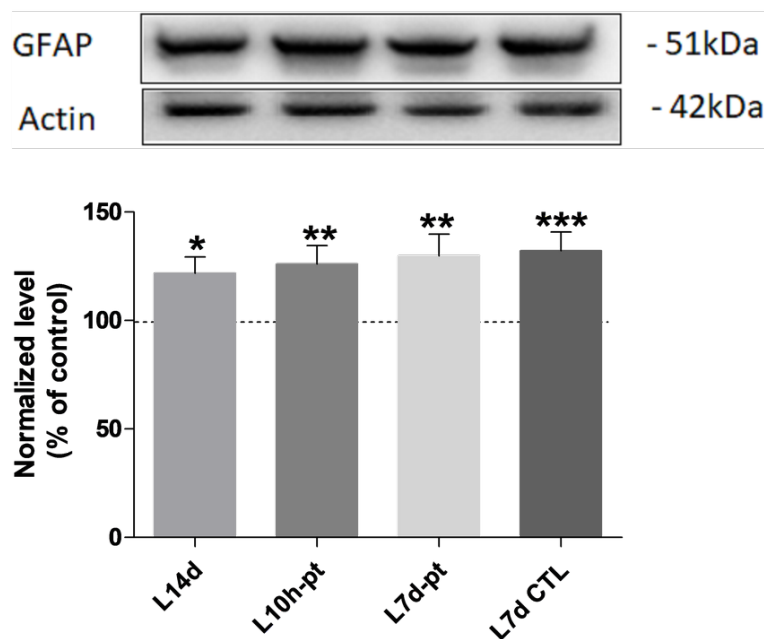


(linha pontilhada). Teste t de Student (n = 6-7 por grupo). L14d: animais com lesão parcial do nervo isquiático e eutanasiados 14 dias após; L10h-pt: animais com lesão do nervo periférico, submetido à atividade física e eutanasiados 10 horas após a última sessão do treino; L7d-pt: animais com lesão do nervo periférico (14 dias após), submetido à atividade física e eutanasiados 7 dias após a última sessão do treino; L7d CTL: grupo controle de animais com lesão do nervo periférico e eutanasiados 21 dias após a cirurgia.

#### 8.4 Perfil de expressão GFAP

Astrócitos desempenham um papel fundamental na manutenção da hipernociceção causada por lesão de nervo periférico. A ligação parcial do nervo isquiático causou um aumento significativo na expressão de GFAP, sugerindo um aumento da atividade de astrócitos (Fig. 18). Entretanto, os protocolos de atividade física não foram suficientes para reduzir ou normalizar o perfil de expressão desta proteína.

Figura 18 – Efeito da atividade física sobre a expressão de GFAP após lesão de nervo periférico.



A lesão de nervo isquiático provocou um aumento significativo na expressão de GFAP (marcador de astrócito) na coluna dorsal da medula espinal após 14 dias da lesão. Este aumento persistiu até o 21º dia após a cirurgia e não foi modificado pela atividade física. Painel superior mostra um ensaio de Western blot com anticorpo anti-GFAP. O anticorpo anti- $\beta$ -Actina foi usado para controle de quantificação de amostras. Painel inferior: quantificação dos níveis de  $\beta$ -Actina nos diferentes grupos. Os dados são apresentados como a média  $\pm$  EPM da porcentagem da razão entre a quantificação de GFAP e  $\beta$ -Actina encontrada nos animais submetidos à cirurgia

fictícia que é considerada como 100% (linha pontilhada). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 e \*\*\*P < 0,001 quando comparado com os animais submetidos à lesão fictícia. Teste t de Student (n = 6-7 por grupo). L14d: animais com lesão parcial do nervo isquiático e eutanasiados 14 dias após; L10h-pt: animais com lesão do nervo periférico, submetido à atividade física e eutanasiados 10 horas após a última sessão do treino; L7d-pt: animais com lesão do nervo periférico (14 dias após), submetido à atividade física e eutanasiados 7 dias após a última sessão do treino; L7d CTL: grupo controle de animais com lesão do nervo periférico e eutanasiados 21 dias após a cirurgia

a explicação pelo fato de o exercício promover analgesia nos animais e não houver diferença nas expressões das proteínas GFAP e P38, deve se ao tempo de treino, número de sessões e intensidade do exercício proposto, no caso cinco sessões de 20min a 50% do limiar anaeróbico, o que pode influenciar em uma resposta positiva ou negativa do exercício(COBIANCHI; NAVARRO, 2016), mais pesquisas são necessárias para determinar a melhor protocolo de treino que seja mais efetivo em normalizar as proteínas GFAP e P38 , no entanto a máxima fase estável podera ser usada como fator de prescrição para este modelo experimental de dor cronica de origem neuropática.

## **9 conclusão**

Foi determinada a máxima fase estável do lactato para o modelo de dor neuropática, possibilitando assim a construção do protocolo de exercício físico.

Concluímos, até o momento, que a menor carga de exercício, 50% da MFEL, promoveu analgesia nos animais que praticaram natação.

o exercício físico não foi capaz de normalizar os níveis de as proteínas GFAP e P38.

Os resultados mostraram que a intensidade do exercício foi determinante na resposta nociceptiva destes animais, apesar de ambos os grupos reverterem os estado de lesão crônica o protocolo de menor intensidade foi escolhido devido a sua menor intensidade e conseqüentemente provocar menos desconforto aos animais e futuramente para indivíduos sedentários portadores de dor crônica.

## Referências

- 1083, P. S. n°. *Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas: Dor Crônica*. 2017. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/840-sctie-raiz/daf-raiz/cgceaf-raiz/cgceaf/13-cgceaf/11646-pcdt>>. Acesso em: 29/07/2017. Citado na página 15.
- AB, M.; AI, B. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain.*, v. 1-2, n. 76, p. 2015 – 222, maio 1998. Citado na página 38.
- AB., S. *et al.* The role of exercise and types of exercise in the rehabilitation of chronic pain: specific or nonspecific benefits. *Curr Pain Headache Rep*, v. 16, p. 153 – 161, 2012. Citado na página 19.
- AL, G. *et al.* Exercise-mediated improvements in painful neuropathy associated with prediabetes in mice. *Pain*, v. 154, p. 2658 – 2667, 2013. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 35.
- ALMEIDA, C. *et al.* Exercise therapy normalizes BDNF upregulation and glial hyperactivity in a mouse modelo of neuropathic pain. *Clinical Medicine.*, v. 156, n. 3, 2015. Citado na página 19.
- AMINOFF, M. *et al.* Sistema Nervoso - Volume 7: Medula Espinal e Sistema Nervoso Periférico - Parte 2. In: \_\_\_\_\_. *Sistema Nervoso - Volume 7: Medula espinal e sistema nervoso periférico - parte 2*. 2. ed. [S.l.: s.n.], 2014. v. 7. Citado na página 17.
- ANTUNES NETO, J. M. F. CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE LACTATO E DOR MUSCULAR TARDIA: ESTRATÉGIA DE AULA PRÁTICA PARA O ENSINO INTEGRADO DOS EVENTOS METABÓLICOS. *Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício*, v. 6, n. 33, p. 2017 – 226, junho 2012. ISSN 1981-9900. Citado na página 26.
- APLICACOESFISIOEX: Aplicação Prática da Fisiologia do Exercício. <https://aplicacoesfisioex.wordpress.com/>. Citado na página 27.
- BARON, B. *et al.* Why does exercise terminate at the maximal lactate steady state intensity? *British Journal of Sports Medicine*, v. 42, n. 10, p. 828 – 833, outubro 2008. Citado 2 vezes nas páginas 29 e 30.
- BEGGS, S.; TRANG, T.; SALTER, M. P2X4R+ microglia drive neuropathic pain. *Nat. Neurosci.*, v. 15, p. 1068 – 1073, 2012. Citado na página 24.
- BENEKE, R. Methodological aspects of maximal lactate steady state-implications for performance testing. *European Journal of Applied Physiology*, v. 89, p. 95 – 99, march 2003. ISSN 1439-6319. Citado na página 29.
- BENEKE, R.; DUVILLARD, S. P. von. Determination of maximal lactate steady state response in selected sports events. *Medicine & Science in Sports & Exercise.*, v. 28, n. 2, p. 241 – 246, fevereiro 1996. ISSN 0195-9131. Citado na página 29.
- BOGEN, O. *et al.* GDNF hyperalgesia is mediated by PLC $\gamma$ , MAPK/ERK, PI3K, CDK5 and Src family kinase signaling and dependent on the IB4-binding protein versican. *Eur J Neurosci*, v. 28, n. 1, p. 12 – 19, julho 2008. Disponível em: <[10.1111/j.1460-9568.2008.06308.x](https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06308.x)>. Citado na página 19.

CA, G. *et al.* Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, v. 130, n. 1, p. 21 – 27, agosto 2001. Citado na página 42.

CAPUTO, F. *et al.* Exercício aeróbio: Aspectos bioenergéticos, ajustes fisiológicos, fadiga e índices de desempenho. *Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum*, v. 102, n. 94, 2009. Citado 2 vezes nas páginas 27 e 28.

CHEIK, N. C. *et al.* Efeitos do exercício físico e da atividade física na depressão e ansiedade em indivíduos idosos. *R. bras. Ci. e Mov.*, v. 11, n. 3, p. 45 – 52, julho 2003. Citado na página 21.

COBIANCHI, S.; NAVARRO, X. Neuroprotective effects of exercise treatments after injury: the dual role of neurotrophic factors. *Current Neuropharmacology*, Barcelona, march 2016. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/299517311>>. Citado na página 49.

COBIANCHIA, 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 – 283, junho 2010. Citado 2 vezes nas páginas 14 e 19.

COULL, J. *et al.* BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*, v. 438, p. 1017 – 1021, 2005. Citado na página 23.

DIXON, W. Efficient Analysis of Experimental Observations. *Formato : AbstratoEnviar para Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v. 20, p. 441 – 462, abril 1980. Citado na página 14.

F., C. *et al.* Determination of the anaerobic threshold by a noninvasive field test in runners. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*, v. 52, p. 869-873, 1982., v. 52, n. 4, p. 869 – 873, abril 1982. Citado na página 32.

FERRINI, F.; KONINCK, Y. D. Microglia control neuronal network excitability via BDNF signalling. *Neural Plasticity*, julho 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/429815>>. Citado na página 23.

FREITAS, R. L. de. Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias (CRID). *Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias (CRID)*, julho 2015. Disponível em: <<http://crid.fmrp.usp.br/site/2015/07/31/dor-neuropatica-e-sua-comorbidade-com-a-depressao/>>. Citado na página 14.

FREITAS, R. L. de. Dor neuropática e sua comorbidade com a depressão. *DOL - Dor on line*, julho 2015. Disponível em: <<http://www.dol.inf.br/Html/EditoriaisAnteriores/Editorial180.pdf>>. Acesso em: 13/11/2017. Citado na página 5.

G, V. *et al.* Pharmacological treatment of chronic pain - the need for CHANGE. *Current Medical Research and Opinion*, v. 26, n. 0, p. 1231 – 1245, março 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1185/03007991003689175>>. Citado na página 19.

GAO, Y.; JI, R. Chemokines, neuronal–glial interactions, and central processing of neuropathic pain. *Pharmacology & Therapeutics Volume 126, Issue 1, April 2010, Pages 56–68*, v. 126, p. 56 – 68, abril 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.01.002>>. Citado na página 14.

HECK, H. *et al.* Justification of the 4-mmol/l Lactate Threshold. *International Journal of Sports Medicine*, p. 117 – 130, 1985. Citado na página 29.

- HUTCHINSON, K. J. *et al.* Three exercise paradigms differentially improve sensory recovery after spinal cord contusion in rats. *Brain* (2004) 127 (6): 1403-1414., v. 6, n. 127, p. 1403 – 1414, junho 2004. Citado na página 14.
- INOUE, K. *et al.* What affects detectability of lesion–deficit relationships in lesion studies? *NeuroImage : Clinical*, Elsevier, v. 6, p. 388 – 397, 2014. ISSN 2213-1582. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4218935/>>. Citado na página 18.
- J, N. *et al.* Non-invasive Stimulation Therapies for the Treatment of Refractory Pain. . *Discov Med*, v. 74, n. 14, p. 21 – 31, 07 2012. Citado 2 vezes nas páginas 5 e 14.
- JA, A. *et al.* Determination of the maximal lactate steady state in obese Zucker rats. *Int J Sports Med*, v. 34, n. 3, p. 2014 – 2017, março 2013. Citado na página 35.
- JAIN, K. K. Current challenges and future prospects in management of neuropathic pain. *Expert Review of Neurotherapeutics*, v. 8, 11 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1586/14737175.8.11.1743>>. Citado na página 5.
- JC, F. *et al.* Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v. 8, n. 34, p. 760 – 765, agosto 2007. Citado na página 35.
- JIANG, Y. G. *et al.* Representations of keypoint-based semantic concept detection: a comprehensive study. *IEEE Transactions*, 2010. Citado 3 vezes nas páginas 5, 14 e 18.
- KK., J. Current challenges and future prospects in management of neuropathic pain. . *Expert Rev Neurother*, v. 8, p. 43 – 56, 2008. Citado 2 vezes nas páginas 5 e 18.
- KOHUT, M. *et al.* Aerobic exercise, but not flexibility/resistance exercise, reduces serum IL-18, CRP and IL-6 independent of betablockers , BMI and psychosocial factors in older adults. *Brain Behav. Immun*, n. 20, p. 2001 – 2009, 2006. Citado na página 22.
- MADRID, B. *et al.* Reprodutibilidade do protocolo de lactato mínimo com intensidade do esforço prévio individualizado pela PSE. *Motriz*, rio claro, v. 18, n. 4, p. 646 – 655, out/nov 2012. Citado na página 32.
- MANCHADO, F. de B. *et al.* Máxima fase estável de lactato é ergômetro-dependente em modelo experimental utilizando ratos. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 12, n. 5, outubro 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-86922006000500007>>. Citado na página 44.
- MARQUEZI, M. L. BASES METABÓLICAS DO CONCEITO LIMIAR ANAERÓBIO  
BASES METABÓLICAS DO CONCEITO LIMIAR ANAERÓBIO CONCEITO LIMIAR ANAERÓBIO . *Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte*, v. 5, n. 2, 2006. Citado na página 27.
- M.BRIDGE, P. *et al.* Nerve Crush Injuries—A Model for Axonotmesis. *Experimental Neurology*, v. 127, p. 284 – 290, junho 1994. Citado na página 46.
- MOURA, R. F. de U.; KOKUBUN, E. U. *Aplicação do modelo de potência crítica na cinética do consumo de oxigênio em exercício supramáximo*. 2006. Dissertação (Mestrado) — Universidade Estadual Paulista (UNESP). Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/87386>>. Citado na página 35.

NICKEL., F. T. *et al.* Mechanisms of neuropathic pain. *European Neuropsychopharmacology*, v. 22, n. 2, p. 81 – 91, fevereiro 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2011.05.005>>. Citado na página 17.

NOAKES, T. D.; GIBSON, A. S. C.; LAMBERT, E. V. From catastrophe to complexity: a novel model of integrative central neural regulation of effort and fatigue during exercise in humans. *Br. J. Sports Med.*, v. 38, p. 511– – 514, 2004. Citado 2 vezes nas páginas 29 e 30.

O., B. *et al.* GDNF hyperalgesia is mediated by PLC $\gamma$ , MAPK/ERK, PI3K, CDK5 and Src family kinase signaling and dependent on the IB4-binding protein versican. . *Eur J Neurosci*, v. 28, p. 12 – 19, julho 2008. Citado na página 14.

Ó, F.; W, K.; T, M. Lactate threshold concepts: how valid are they? *Sports Med.*, v. 6, n. 39, p. 469 – 490, 2010. Citado na página 28.

OKANO, A. H. *et al.* Comparação entre limiar anaeróbio determinado por variáveis ventilatórias e pela resposta do lactato sanguíneo em ciclistas. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, scielo, v. 12, p. 39 – 44, 02 2006. ISSN 1517-8692. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scieloOrg/php/articleXML.php?lang=pt&pid=S1517-86922006000100008>>. Citado na página 31.

PE, D. A. P. *et al.* The relationship between the heart rate deflection point test and maximal lactate steady state. *J Sports Med Phys Fitness*, v. 56, n. 5, p. 497 – 502, maio 2015. Citado na página 33.

PETERSEN, A.; PEDERSEN, B. The anti-inflammatory effect of exercise. *J. Appl. Physiol.*, v. 4, n. 98, p. 1154 – 1162, 2005. Citado na página 22.

PLOEGER, H. *et al.* The effects of acute and chronic exercise on inflammatory markers in children and adults with a chronic inflammatory disease: a systematic review. *Exerc. Immunol.*, v. 15, p. 6 – 41, 2009. Citado na página 22.

S, C. *et al.* Neuroprotective Effects of Exercise Treatments After Injury: The Dual Role of Neurotrophic Factors. *Current Neuropharmacology*, v. 15, n. 4, p. 495 – 518, 2017. Citado 2 vezes nas páginas 22 e 23.

SABATIER, M. J. *et al.* NEUROPROTECTIVE AND NEUROREGENERATIVE EFFECTS OF LOWINTENSITY AEROBIC EXERCISE ON SCIATIC NERVE CRUSH INJURY IN MICE. *Neuroscience*, v. 194, p. 337 – 348, outubro 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.07.075>>. Citado 2 vezes nas páginas 44 e 46.

SCHESTATSKY, P. DEFINIÇÃO, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA DOR NEUROPÁTICA. *Rev HCPA*, v. 3, n. 28, p. 177 – 187, 2008. Citado na página 16.

SCHESTATSKY, P.; NASCIMENTO, O. J. Neuropathic pain. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, scielo, v. 67, p. 1166 – 1167, 12 2009. ISSN 0004-282X. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scieloOrg/php/articleXML.php?lang=en&pid=S0004-282X2009000600039>>. Citado na página 16.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain.*, v. 43, n. 2, p. 205 – 218, novembro 1990. Disponível em: <<https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=1982347>>. Citado 2 vezes nas páginas 38 e 39.

SLUKA, K. *et al.* Regular physical activity prevents development of chronic pain and activation of central neurons. *J Appl Physiol*, v. 114, p. 725 – 733, 2013. Citado na página 19.

TJ, P.; F, C.; Y. de K. Role of cation-chloridecotransporters (CCC) in pain and hyperalgesia. *Curr Top Med Chem.*, v. 5, n. 6, p. 547 – 555, 2005. Citado na página 24.

TRANG, T.; BEGGS, S.; SALTER, M. W. ATP Receptors Gate Microglia Signaling in Neuropathic Pain. *Experimental neurology*, v. 234, n. 2, p. 354 – 361, 4 2012. ISSN 0014-4886. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3748033/>>. Citado na página 24.

TSUDA, M. *et al.* Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in ‘small’ glia. *Trends in Neurosciences*, Volume 28, Issue 2, 101 - 107, v. 28, p. 101 – 107, 2005. Citado na página 18.



WWW.MMCUIDADOSINTENSIVOS.CO.CC, . lactato. : [www.mmccuidadosintensivos.co.cc](http://www.mmccuidadosintensivos.co.cc). Citado na página 27.

ZAGATTO, A. M. *et al.* Avaliação da capacidade aeróbica através do sangue e respostas ventilatórias em quatro ergômetros diferentes. *Rev Bras Cineantropom Desempenho Humano*, v. 15, n. 3, 2013. Citado na página 33.



## **Anexos**

**Figura 19 – textbfPROTOCOLO EXPERIMENTAL APROVADO PELO CEUA-FMRP-USP NO.095/2015.**

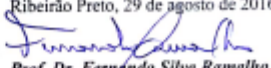
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado "*Avaliação da intensidade do exercício físico sobre o seu efeito antinociceptivo em modelo experimental de neuropatia periférica utilizando a máxima fase estável do lactato como marcador da capacidade aeróbica*", registrado com o número 095/2015, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Guilherme de Araujo Lucas**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 29 de agosto de 2016.

Este Protocolo prevê a utilização de 192 camundongos Balb/c machos pesando 20g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 29/08/2016 a 06/09/2017.

We certify that the Protocol nº 095/2015, entitled "*Evaluating exercise intensity on its antinociceptive effect following peripheral nerve injury based on the maximal lactate steady state as a marker of aerobic capacity*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 08/29/2016. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from phylum *Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 192 male Balb/c mice weighing 20g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 09/06/2017.

Ribeirão Preto, 29 de agosto de 2016  
  
**Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho**  
 Presidente da CEUA – FMRP – USP

---

Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo  
(16)3315-3301