



UNISUL
UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
FERNANDO SOLDI

**AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL ATIVIDADE ANTI-ALODÍNICA INDUZIDA POR
EXERCÍCIO FÍSICO E POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO EM MODELO DE
SÍNDROME DA DOR COMPLEXA REGIONAL-I EM CAMUNDONGOS**

Tubarão

2012

FERNANDO SOLDI

**AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL ATIVIDADE ANTI-ALODÍNICA INDUZIDA POR
EXERCÍCIO FÍSICO E POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO EM MODELO DE
SÍNDROME DA DOR COMPLEXA REGIONAL-I EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências da Saúde, da Universidade do Sul de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Anna Paula Piovezan, Dra.

Tubarão

2012

FERNANDO SOLDI

**AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL ATIVIDADE ANTI-ALODÍNICA INDUZIDA POR
EXERCÍCIO FÍSICO E POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO EM MODELO DE
SÍNDROME DA DOR COMPLEXA REGIONAL-I EM CAMUNDONGOS**

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade do Sul de Santa Catarina.

Tubarão, 06 de agosto de 2012.

Professora e orientadora: Anna Paula Piovezan, Dra.

Universidade do Sul de Santa Catarina.

Professora: Gislaine Tezza Rezin, Dra.

Universidade do Sul de Santa Catarina

Professor: Irene Clemes Kulkamp, Dra.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Enelides Carmine Soldi e Nelson Soldi (in memorian), grandes exemplos, os quais sempre apoiaram-me e ensinaram-me a agir com dignidade.

Ao meu amor, Angélica Campos de Oliveira, que sempre esteve ao meu lado, apoiando-me e dando força pra seguir em frente, mesmo nos momentos mais difíceis.

A minha orientadora, profa. Dra. Anna Paula Piovezan, pela orientação, paciência e compreensão em todas as etapas da elaboração deste trabalho.

A Leidiane Mazzardo Martins e Daniel Fernandes Martins por todo o aprendizado adquirido no Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação e ajuda no processo de desenvolvimento da pesquisa.

Ao prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos por ter aberto as portas do laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação, da Universidade Federal de Santa Catarina.

Aos professores, Dra. Gislaine Tezza Rezin e Dra. Irene Cleme Kulkamp, por aceitarem o convite de compor a Banca Examinadora.

A todos aqueles que de forma direta e indireta contribuíram para esta Pesquisa.

RESUMO

Objetivo: O exercício físico, incluindo aquele realizado em meio aquático, é frequentemente utilizado para reduzir diversos fatores relacionados ao desenvolvimento de dor, em diferentes condições patológicas. Contudo, a melhor forma de aplicá-lo (modalidade e intensidade), bem como os mecanismos pelo qual o exercício promove redução da dor ainda não estão bem estabelecidos. O presente estudo objetivou avaliar a influência do exercício de natação de alta intensidade sobre a alodínia mecânica, produzida por um modelo de SDCR-I em camundongos (DPIC), e a possível contribuição dos sistemas opióide e adenosinérgico endógenos neste efeito. **Método:** Utilizou-se um protocolo de natação (30 min/dia em água a 37°C), por 5 dias consecutivos, após o 7º dia de indução de isquemia-reperfusão (IR) na pata dos animais (camundongos *Swiss* machos, cerca de 30 g) responsável pelo desenvolvimento de alodínia mecânica. A alodínia mecânica foi avaliada através dos filamentos de Von Frey, registrando-se a frequência de retirada da pata ao estímulo de 0,4 g (em 10 aplicações), imediatamente antes ou 30 min após a realização do exercício. Para determinar o envolvimento dos sistemas opióide e adenosinérgico, a naloxona (1 mg/Kg, i.p., antagonista não-seletivo de receptores opióides), a cafeína (10 mg/Kg, i.p., antagonista não-seletivo de receptores adenosinérgicos), o DPCPX (0,1 mg/Kg, i.p., antagonista seletivo de receptores A₁ de adenosina) ou ZM241385 (3 mg/Kg, i.p., antagonista seletivo de receptores A_{2A} de adenosina) foram administrados 20 minutos antes do exercício. **Resultados:** O grupo *sham*, que não sofreu a IR da pata, não mostrou alteração na frequência de retirada da pata no teste de von Frey durante todo o período de avaliação do estudo. Já o grupo não-exercitado, sete dias após a IR, apresentou um aumento significativo ($p < 0,001$) da hipersensibilidade mecânica (alodínia) quando comparado ao grupo *sham* ($p < 0,001$). Por sua vez, o grupo exercitado mostrou uma diminuição significativa da frequência de retirada da pata em relação ao grupo não-exercitado ($p < 0,001$), já aos 30 min após a primeira sessão de exercício de alta intensidade na água, mostrando uma ação antinociceptiva ao estímulo mecânico no modelo (DPIC). Ao analisar a área sobre a curva (AUC) observou-se uma reversão significativa do efeito antinociceptivo induzida pelo exercício nos camundongos que receberam tratamento prévio com naloxona (salina: $353,8 \pm 13,3$; naloxona: $668,8 \pm 45,8$; $p < 0,001$), cafeína (salina: $353,8 \pm 13,3$; cafeína: $782,5 \pm 22,0$; $p < 0,001$), DPCPX (salina: $395,6 \pm 13,3$; DPCPX: $686,3 \pm 45,8$; $p < 0,001$) e ZM241385 (salina: $395,6 \pm 13,3$; ZM241385: $490,0 \pm 18,9$; $p < 0,05$) quando comparados aos respectivos grupos controle (salina). **Conclusões:** Este estudo demonstrou que sessões repetidas de exercício de alta intensidade atenuam a

hipersensibilidade mecânica induzida por IR em um modelo de SDCR-I. Ainda, sugere a participação dos receptores opióides e, ao que tudo indica pela primeira vez, a participação dos receptores A_1 e A_{2A} para adenosina neste efeito. Sugere-se a continuidade deste estudo, como forma de estabelecer a melhor modalidade e intensidade dos exercícios que possam servir como uma alternativa no tratamento da SDCR-I.

Palavras-chave: SDCR-I. Exercício. Natação. Opióides. Adenosina. Alodínia.

ABSTRACT

Objective: Physical exercise, including the one done one in water, is generally used to reduce several factors related to the development of pain in different pathological conditions. However, the best way to apply it (type and intensity) as well as the mechanisms in which the exercise generates the reduction of pain is still not well established. The present study aimed to evaluate the influence of the swimming exercise of high intensity over the mechanical allodynia produced by a model of CRPS-I in mice (CPIP), and the possible contribution of endogenous adenosinergic and opioid systems in this effect. **Method:** It has been used a protocol of swimming (30 min / day in water at 37 degrees C) for 5 consecutive days, after the seventh day of induction of ischemia-reperfusion (IR) in the paws of animals (male Swiss mice, about 30 g) responsible for the development of mechanical allodynia. The mechanical allodynia was assessed using von Frey filaments, recording the frequency of paw withdrawal to stimulation of 0.4 g (10 applications), immediately before or 30 min after exercise completion. To determine the involvement of the opioid and adenosinergic systems, naloxone (1 mg / kg, ip, non-selective antagonist opioid receptor), caffeine (10 mg / kg, ip, non-selective antagonist receptor adenosinergic), the DPCPX (0,1 mg / kg, ip, selective antagonist of A1 adenosine receptors) or ZM241385 (3 mg / kg, ip, selective antagonist of adenosine A2A receptor) were administered 20 minutes before the exercise. **Results:** The *sham* group, which did not suffer paw IR showed no change in frequency of paw withdrawal in von Frey test for the entire evaluation period of the study. The group non-exercised, seven days after IR, presented a significant increase ($p < 0,001$) of the mechanical hypersensitivity (allodynia) compared to *sham* group ($p < 0,001$). In turn, the exercised group showed a significant decrease of paw withdrawal frequency compared to the non-exercised, already at 30 min after the first session of high intensity exercise in the water, showing an antihypernociceptive action to mechanical stimuli in the model (CPIP). When the area under the curve (AUC) was observed it was noticed a significant reversal of the antihypernociceptive effect induced by the exercise in mice that were pretreated with naloxone (saline: $353,8 \pm 13,3$; naloxone: $668,8 \pm 45,8$; $p < 0,001$), caffeine (saline: $353,8 \pm 13,3$; caffeine: $782,5 \pm 22,0$; $p < 0,001$), DPCPX (saline: $395,6 \pm 13,3$; DPCPX: $686,3 \pm 45,8$; $p < 0,001$) and ZM241358 (saline: $395,6 \pm 13,3$; ZM241385: $490,0 \pm 18,9$; $p < 0,05$) respectively compared with the group exercised more saline. **Conclusions:** This study demonstrates that repeated sessions of high intensity exercise attenuates the IR-induced mechanical hypersensitivity in a model of CRPS-I. Besides, it suggests the involvement of opioid receptors, and it seems, for the first time the participation

of A1 and A2 receptors for adenosine in this effect. It is suggested to continue this study as a way to establish the best mode and intensity of exercise that can serve as an alternative in the treatment of CRPS-I.

Keywords: CRPS-I. Exercise. Swimming. Opioids. Adenosine. Allodynia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sintomas clínicos da Síndrome da Dor Complexa Regional.....	15
Figura 2 - Descrição da hipótese envolvendo os mecanismos fisiopatológicos do modelo da DPIC e um subconjunto dos eventos da SDCR-I.....	19
Figura 3 - Comparação entre a pata do animal com DPIC e pé adulto com SDCR-I.....	20
Figura 4 - Representação da caixa plástica utilizada para realização do protocolo de exercício físico, de natação de alta intensidade nos camundongos.....	28
Figura 5 - Fluxograma dos testes empregados no estudo.....	29
Figura 6 - Ilustração do procedimento de avaliação da alodínia mecânica com o monofilamento de <i>von Frey</i>	31
Figura 7 - Exercício de natação de alta intensidade, repetido por 5 dias, reduz a alodínia mecânica (efeito anti-hipernociceptivo) no modelo animal de SDCR-I.....	35
Figura 8 - Naloxona reverte o efeito anti-alodínico produzido pelo exercício de alta intensidade no modelo animal de SDCR-I.....	36
Figura 9 - Cafeína reverte o efeito anti-alodínico produzido pelo exercício de alta intensidade no modelo animal de SDCR-I.....	38
Figura 10 - DPCPX reverte o efeito anti-alodínico produzido pelo exercício de alta intensidade no modelo animal de SDCR-I.....	39
Figura 11 - ZM241385 reverte o efeito anti-alodínico produzido pelo exercício de alta intensidade no modelo animal de SDCR-I.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Critérios diagnósticos para a SDCR-I e SDCR-II de acordo com a IASP.....	12
Tabela 2 - Sintomas da SDCR-I após um ano e meio de seguimento, todos receberam tratamento de fisioterapia e medicamentos (analgésicos orais e anti-inflamatórios).....	16
Tabela 3 - Descrição dos grupos de estudos.....	27
Tabela 4 - Protocolo de natação de alta intensidade.....	29

LISTA DE SIGLAS

ADP – Difosfato de Adenosina
AIE – Antinocicepção induzida pelo stress
AMP – Monofosfato de Adenosina
ATP – Trifosfato de Adenosina
AVDs – Atividades de Vida Diária
DASH – Disabilities of the Arm, Shoulder and Hand
DMSO - Dimetil Sulfóxido
DPCPX - 1,3 – dipropyl-8-cyclopentylxanthine
DPIC – Dor Pós Isquêmica Crônica
IASP – International Association for the Study of Pain
i.p – Intraperitoneal
IR – Isquemia-Reperfusão
PCPA - p-clorofenilalanina metil éster
PO – Pós-operatório
SF-36 – Outcomes Study 36-item Short-form Health Survey
SDCR-I – Síndrome da Dor Complexa Regional tipo I
SDCR-II – Síndrome da Dor Complexa Regional tipo II
TENS – Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation
ZM241385 - 4 – (2-[7-amino-2-(2-furil) [1,2,4] triazolo [2,3-a] [1,3,5] triazin-5-ilamino] etil)-
fenol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 JUSTIFICATIVA	23
3 OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL.....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 ANIMAIS	26
4.2 INDUÇÃO DA LESÃO POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO (IR)	26
4.3 PROTOCOLO DO EXERCÍCIO FÍSICO	28
4.4 AVALIAÇÃO DA ALODÍNIA MECÂNICA.....	30
4.5 MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA	31
4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A ALODÍNIA MECÂNICA NO MODELO DE SDCR-I.....	31
4.7 AVALIAÇÃO DO POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES OPIÓIDES NO EFEITO ANTI-ALODÍNICO INDUZIDO PELO EXERCÍCIO FÍSICO NO MODELO DE SDCR-I	32
4.8 AVALIAÇÃO DO POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES ADENOSINÉRGICOS NO EFEITO ANTI-ALODÍNICO INDUZIDO PELO EXERCÍCIO FÍSICO NO MODELO DE SDCR-I	32
4.9 DROGAS E REAGENTES	33
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
5 RESULTADOS	34
6 DISCUSSÃO	41
7 CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

A síndrome da dor complexa regional (SDCR) é o nome atual de uma síndrome que foi conhecida ao longo dos anos por mais de 72 nomes, incluindo causalgia, causalgia menor, algodistrofia, síndrome ombro-mão ou atrofia de *Sudeck* (VAN EIJS et al., 2011). No entanto, o nome que mais vem sendo utilizado recentemente para designar a SDCR é o de distrofia simpático-reflexa (CODERRE, 2011).

Em 1864, Silas Weir Mitchell foi um dos primeiros a observar dor constante em queimação combinado com alterações tróficas, em soldados que sofreram lesão nervosa periférica, denominando a condição de causalgia. Evans, em 1946, introduziu o termo distrofia simpático-reflexa, pois acreditava que os transtornos de dor estavam, de alguma forma, relacionados com a hiperatividade simpática. Paul Sudeck, por volta de 1990, observou que a síndrome era acompanhada de sintomas inflamatórios e que estes poderiam se espalhar além da região dos danos iniciais (STANTON-HICKS, 1995). Porém, ainda hoje há falta de evidências da patogênese inflamatória e simpática. Em 1994, a *International Association for the Study of Pain* (IASP), após uma reavaliação nomeou este quadro de SDCR (MAIHOFNER; SEIFERTA; MARKOVIC, 2010; FELIU; EDWARDS, 2010).

Na Tabela 1, a seguir, podemos observar as principais características que diferenciam a SDCR, de forma a classificá-la em dois tipos, a SDCR tipo I (SDCR-I) e tipo II (SDCR-II).

Tabela 1- Critérios diagnósticos para a SDCR-I e SDCR-II de acordo com a IASP.

(continua)

SDCR-I (Distrofia Simpático Reflexa)	SDCR-II (Causalgia)
1. Presença de um evento nocivo iniciador ou causa de uma imobilização.	1. Presença de dor contínua, alodínia ou hiperalgisia após uma lesão do nervo, não necessariamente limitado à distribuição do nervo lesado.
2. Dor contínua, alodínia (dor a um estímulo que normalmente não provoca dor) hiperalgisia (um aumento da resposta a um estímulo que normalmente é doloroso), com dor desproporcional a qualquer	2. Evidências em algum momento de edema, alteração do fluxo de sangue na pele ou atividade sudomotora anormal na região da dor.
	3. Outras causas de dor ou disfunção são

Tabela 1 - Critérios diagnósticos para a SDCR-I e SDCR-II de acordo com a IASP.

(conclusão)	
SDCR-I (Distrofia Simpático Reflexa)	SDCR-II (Causalgia)
evento iniciador.	excluídos.
3. Evidências em algum momento de edema, alteração do fluxo de sangue na pele ou atividade sudomotora anormal na região da dor.	**
4. Outras causas de dor ou disfunção são excluídos	
*	

Fonte: Adaptado Coderre, 2011.

* Critérios de 2-4 devem ser satisfeitos.

** Todos os 3 critérios devem ser satisfeitos.

Dados epidemiológicos sobre SDCR na população ainda são escassos, sendo os estudos principalmente baseados em achados hospitalares. Estudo retrospectivo a partir de registros de 600.000 pacientes na Holanda mostrou que a taxa de incidência estimada de SDCR na população foi de 26,2/ 100.000/ ano (DE MOS et al., 2007). Com relação à SDCR-I, um estudo de base populacional em um condado de Minnessota, nos Estados Unidos da América, encontrou uma prevalência de SDCR-I de 20,6 por 100.000 pessoas e uma taxa de incidência de 5,5 por 100.000 habitantes/ ano (SANDRONI et al., 2003). De acordo Choi e colaboradores (2008), a razão encontrada entre os tipos SDCR-I e SDCR-II é de 7:3, respectivamente. Estudo recente de coorte prospectivo multicêntrico, realizado por Beerthuinzen e colaboradores (2012), com 596 pacientes que apresentavam SDCR-I subsequente a fraturas de membros inferior ou superior, identificou que a prevalência desta condição variou de 7,0% a 48,5%, dependendo do critério diagnóstico empregado; o que pode justificar diferenças de dados epidemiológicos entre diferentes estudos.

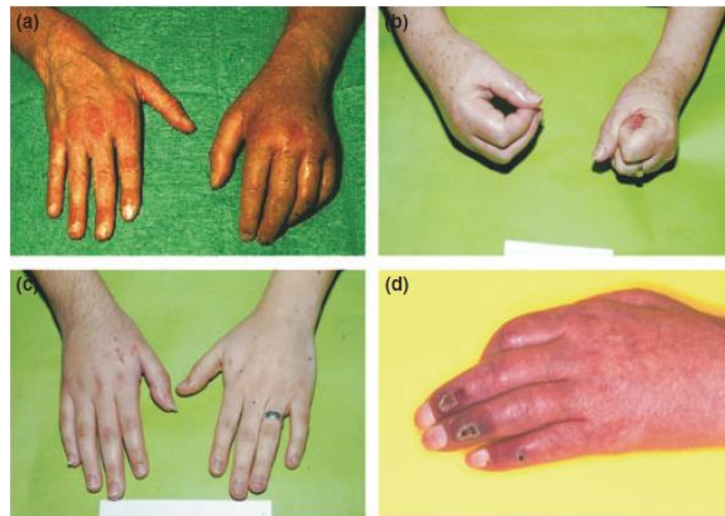
Quanto ao gênero, foi observada uma relação de 3,4-4:1 entre mulheres e homens, respectivamente, com uma idade média de 46 anos para o início dos sintomas, sendo os membros superiores duas vezes mais afetados que os membros inferiores (DE MOS et al., 2007; SANDRONI et al., 2003). No estudo de Allen, Galer e Schwartzs (1999), foi observada uma ligeira diferença quanto às extremidades atingidas, sendo maior na extremidade inferior (48%) em relação à extremidade superior (44%); além disso, os autores relataram um caso na

face e 17% dos sujeitos estudados com sintomas bilaterais. Para De Mos e colaboradores (2007), a mulher na menopausa parece ter um maior risco de desenvolver a SDCR e Beerthuisen e colaboradores (2012) identificaram uma maior susceptibilidade de desenvolver a SDCR-I em pacientes com artrite reumatóide e comorbidades musculoesqueléticas (dor lombar e artrose) associadas.

Como causas prévias da SDCR-I, um estudo registrou as fraturas ou cirurgias (40%), seguida de descompressão do nervo mediano (30%), de pequenos traumas como torções (10%), de lesão radicular (9%), de lesão medular (6%), além daqueles casos com desenvolvimento espontâneo (MAIHÖFNERA; SEIFERT; MARKOVIC, 2010). Para De Rooij e colaboradores (2010), pacientes que desenvolvem espontaneamente a SDCR-I são mais jovens do que o observado para as outras causas da doença, bem como o tempo de duração da mesma é mais prolongado; possivelmente indicando uma maior propensão para o desenvolvimento desta condição.

Entre os sintomas mais comuns da SDCR estão dor espontânea, descoloração da pele, alteração da temperatura, edema e amplitude ativa limitada de movimento (VELDMAN et al., 1993). Além disso, observa-se hiperalgesia (percepção dolorosa aumentada a um estímulo nociceptivo), alodínia (percepção dolorosa para um estímulo não nociceptivo) mecânica e ao frio, distúrbios vasomotores e sudomotores, alterações tróficas da pele, unhas e ossos, bem como distonia (CODERRE e BENNETTI, 2010), sendo alguns destes sintomas ilustrados na Figura 1.

Figura 1 - Sintomas clínicos da Síndrome da Dor Complexa Regional.



Fonte: Maihöfner; Seifert; Markovic, 2010.

Legenda: Painel a) fase aguda da SDCR-I mostrando descoloração, inflamação e comprometimento da função da mão esquerda após fratura distal do rádio; painel: b) inchaço e mobilidade reduzida na tentativa de fechar a mão (SDCR-II); painel c) hipertricose da mão direita (SDCR-I); painel d) contraturas, cor azulada da pele e distúrbios tróficos crônicos na SDCR-I.

Segundo Bruehl e colaboradores (2002), acredita-se que pode ocorrer uma progressão temporal dos sinais e sintomas na SDCR-I, resultando em três estágios: o estágio 1 compreenderia dor e anormalidades sensoriais (hiperalgesia e alodínia), sinais de disfunção vasomotora, proeminente edema e distúrbio vasomotor; o estágio 2, com dor mais acentuada, disfunção sensorial, evidência continuada de disfunção vasomotora e desenvolvimento significativo de alterações tróficas/motoras; no estágio 3 ocorreria diminuição da dor e perturbação sensorial, distúrbio vasomotor contínuo e marcante aumento da alteração trófica motora. No entanto, existem evidências de que essa progressão não está presente em todos os pacientes (CODERRE; BENNETTI, 2010).

A Tabela 2 demonstra os resultados do estudo realizado por Savas e colaboradores (2009), que avaliou a deficiência do membro superior de 30 pacientes com SDCR-I após um ano e meio de seguimento em que estes receberam atendimento de fisioterapia e medicamentos. Dos 30 pacientes acompanhados, somente 4 (13,3%) não referiram sintoma algum ao término do período de observação e apenas 7 (23,3%) estavam livres de dor em repouso. Entre os sintomas mais frequentes estavam dor após o uso do membro afetado (86,6%), seguido de dor em repouso (76,6%) e rigidez dos dedos pela manhã (53,3%). Ainda segundo estes autores, além da atividade do membro superior reduzida, aspectos importantes da qualidade de vida destes sujeitos, medidos pelo questionário SF-36, estavam significativamente alterados quando comparado ao grupo controle.

Tabela 2 - Sintomas da SDCR-I após um ano e meio de seguimento, todos receberam tratamento de fisioterapia e medicamentos (analgésicos orais e anti-inflamatórios).

Sintomas	Número de pacientes (n=30)	Porcentagem (%)
Dor após o uso	26	86,6
Dor na mão em repouso	23	76,6
Rigidez dos dedos pela manhã	16	53,3
Intolerância ao frio	15	50,0
Dor no ombro	15	50,0
Dor na mão relacionada ao clima	15	50,0
Dormência nos dedos	12	40,0
Congelamento ou sensação de queimadura na mão	12	40,0
Sensibilidade ao toque	10	33,3
Cianose ou palidez a exposição ao frio	5	16,6
Edema anormal na mão	5	16,6

Fonte: Modificado de Savas et al., 2009.

Beerthuisen e colaboradores (2012) também verificaram em seu estudo que três meses após o diagnóstico de SDCR-I os escores do componente físico do questionário de qualidade de vida SF-36 para estes pacientes era significativamente menor quando comparados aos dos pacientes sem SDCR-I; além disso, um ano após o trauma nenhum dos pacientes com SDCR-I estavam livres dos sintomas. Outro estudo retrospectivo que avaliou sinais e sintomas de adultos que foram diagnosticados com SDCR-I na infância mostrou que, mesmo após muitos anos, 52% dos pacientes ainda se queixavam de dor e 33% ainda apresentaram recidivas e diminuição da qualidade de vida (TAN et al., 2009). Especificamente em relação às crianças, foram identificados outros problemas de saúde associados com a SDCR-I incluindo depressão, ansiedade, dor de cabeça e enxaqueca, além de transtornos alimentares; estes sintomas também foram relacionados ao registro de vários dias de faltas escolares para 88% dos sujeitos do estudo (BROOKE; JANSELEWITZ, 2012).

Com relação aos diferentes tipos de tratamento empregados na SDCR, um estudo realizado por Choi e colaboradores (2008) em um centro de dor crônica na Coréia, revelou que as modalidades de tratamento mais utilizadas para a mesma foram respectivamente a farmacoterapia, seguida pelo bloqueio do nervo simpático, infusão intravenosa de ketamina e bloqueio do nervo espinhal. Tais modalidades também foram registradas no tratamento dos 74 pacientes com SDCR-I encontrados no condado em Minnesota-EUA (SANDRONI et al. 2003), com diferentes percentuais de uso nos pacientes, sendo que destes 93% foram submetidos a fisioterapia, 35% a bloqueio simpático e 49% receberam tratamento medicamentoso.

A fisioterapia é um dos recursos mais utilizados no tratamento da SDCR-I, oferecendo diferentes modalidades de tratamento aos pacientes tais como treinamento sensorio motor, exercícios ativos e passivos, terapia manual, eletroterapia e educação do paciente sobre movimentos adequados e que devem ser evitados. Apesar disto, existe pouca evidência científica que sustente a recomendação destes procedimentos. Pensando em avaliar criticamente as evidências sobre a eficácia da fisioterapia no gerenciamento da SDCR-I em adultos, Daly e Bialocerkowski (2009) realizaram uma revisão sistemática da literatura para estudos em que a fisioterapia foi o único, ou o predominante, meio de intervenção. Estes autores encontraram evidências de que o procedimento de imagética motora gradual como meio de redução da dor nesta condição; por outro lado, nenhuma evidência foi encontrada para apoiar os demais tratamentos frequentemente recomendados pelas diretrizes clínicas. Finalmente, é possível pensar que a fisioterapia não apresenta efeitos benéficos isoladamente, esta possa ser associada a outras modalidades para obter tais resultados. De acordo com isto, Brooke e Janslewitz (2012) realizaram um estudo com crianças portadoras de SDCR-I para as quais terapêuticas anteriores haviam falhado. O tratamento hospitalar intensivo das crianças (mínimo de 5 horas por dia/5 dias por semana) com terapia física, ocupacional e psicológica resultou em resolução da dor para 34% dos pacientes no momento da alta, com 95% de restabelecimento da função física em uma média de 2 meses.

Outra modalidade de tratamento extensivamente prescrito para lesões músculo-esqueléticas em doenças crônicas com o objetivo de reduzir os sintomas como a dor é o exercício físico em solo e em meio aquático (EVCIK et al., 2008; EVERSDEN et al., 2007). O exercício também se constitui numa medida economicamente mais viável para a manutenção da função destes indivíduos.

Quanto aos benefícios observados com exercícios físicos em diferentes patologias, o mesmo reduz fatores de risco para hipertensão, diabetes e doenças cardiovasculares,

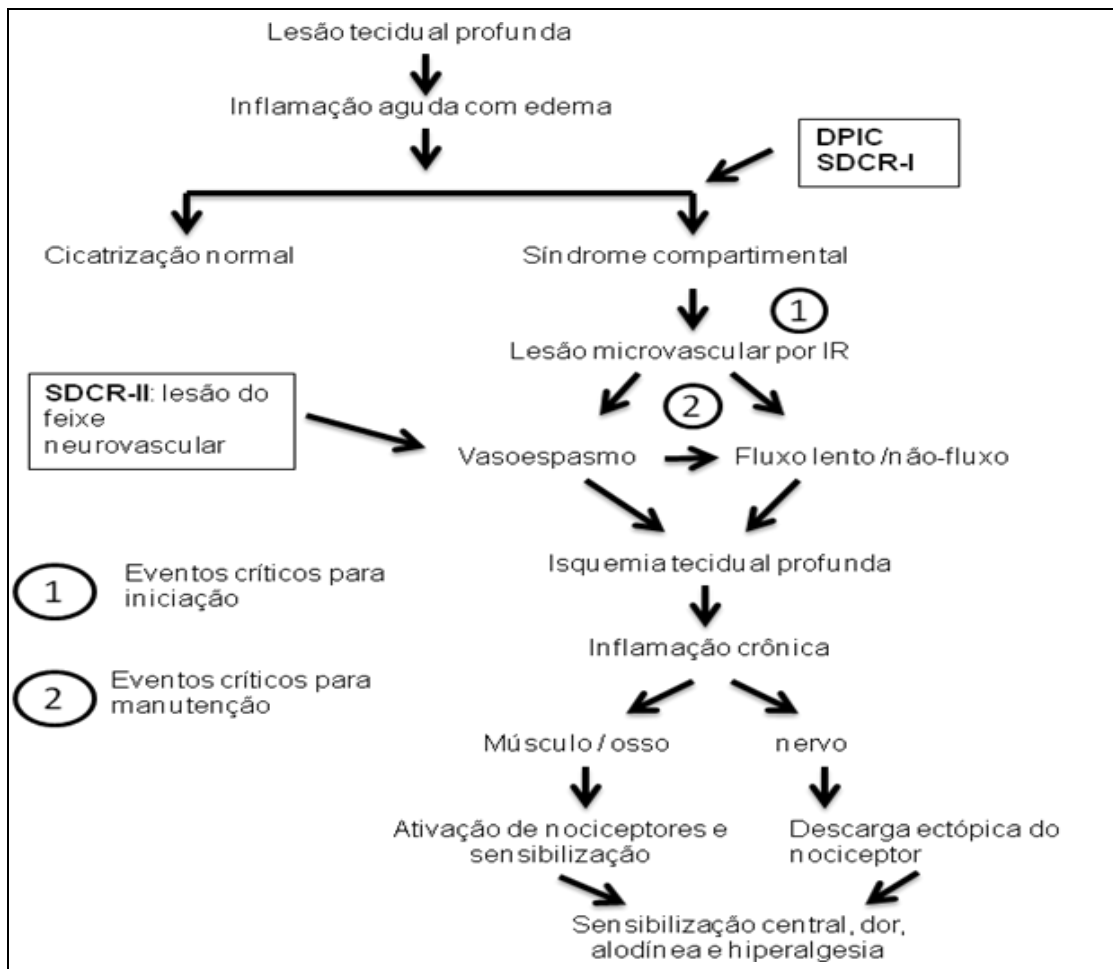
promove a neuroplasticidade e a neuroproteção, aumenta a plasticidade sináptica e a angiogênese, induz fatores de crescimento e melhora a cognição, além de promover atividade ansiolítica e antidepressiva. Além disso, o exercício físico também pode modificar o limiar de neurônios sensoriais a estímulos nociceptivos (COTMAN; BERCHTOLD; CHRISTIE, 2007; MAZZARDO-MARTINS, 2010; KOLTYN, 2000) e, sendo assim, vários destes fatores fundamentam a utilização de diferentes protocolos de exercícios no tratamento de doenças crônicas dolorosas tais como a fibromialgia, a dor lombar e a dor miofascial (MAZZARDO-MARTINS, 2010).

Pelo exposto acima, dada a relevância desta condição clínica, recentemente foram desenvolvidos dois modelos animais para permitir avaliar a fisiopatologia, bem como o efeito de diferentes tratamentos especificamente sobre a SDCR-I. Os modelos de dor crônica pós-fratura e o modelo de dor pós-isquêmica crônica (DPIC), simulam a sintomatologia da SDCR-I e possuem evidências que suportam sua utilização para a pesquisa, principalmente porque os efeitos promovidos são semelhantes aos sintomas observados em humanos (GUO et al., 2004; BRUEHL, 2010; CODERRE; BENNETTI, 2010). A partir do modelo de DPIC, por exemplo, foi possível identificar o envolvimento de vias simpáticas nas alterações nociceptivas, além de neuropeptídeos e citocinas pró-inflamatórias na SDCR-I; já o modelo de pós-fratura permitiu demonstrar que estes últimos mediadores contribuem, em animais, para o aparecimento de sintomas.

Dentre os dois modelos citados, o mais empregado é o de DPIC. Este envolve a oclusão por 3 horas do fluxo sanguíneo em um dos membros posteriores dos animais, por meio da colocação de um torniquete proximal à articulação do tornozelo (CODERRE et al., 2004; BRATTI, 2011). Após a reperfusão, os animais apresentam um quadro inicial de hiperemia e edema, seguido de hiperalgesia mecânica, alodínia a estímulos mecânicos e térmicos (frio), sendo que estas alterações sensoriais se estendem por 1 mês em pelo menos 70% dos animais. Dois dias após a reperfusão, o animal apresenta dor inflamatória e, no sétimo dia, dor neuropática (CODERRE et al., 2004; CODERRE; BENNETTI, 2010; BRATTI, 2011)

De acordo com Coderre e Benetti (2010), uma das hipóteses para o aparecimento da dor observada no modelo de DPIC, assim como ocorre na SDCR-I em humanos, é a persistente isquemia nos tecidos profundos, com consequente reação inflamatória produzida pela patologia microvascular, subsequente a uma lesão de isquemia-reperfusão (IR). As alterações que seguem na figura 2 demonstram os pontos fundamentais do processo de iniciação, desenvolvimento e manutenção da DPIC e SDCR-I.

Figura 2 - Descrição da hipótese envolvendo os mecanismos fisiopatológicos do modelo da DPIC e um subconjunto dos eventos da SDCR-I.



Fonte: Adaptado de Coderre; Bennet, 2010.

Nos pacientes com SDCR-I, a lesão tecidual profunda leva a edema e síndrome compartimental. A reperusão (liberação do torniquete no modelo animal) leva à lesão das células endoteliais microvasculares induzidas pelos radicais livres. Estes eventos levam a vasoespasmo arterial e fluxo lento/não-fluxo na microvasculatura dos tecidos profundos, produzindo isquemia persistente propagando a IR, e as causas crônicas de inflamação. No músculo e osso, a inflamação (incluindo a geração de lactato) e isquemia resultante ativam e sensibilizam os nociceptores. No nervo, a isquemia e inflamação causam descarga ectópica no nociceptor. A lesão de um feixe neurovascular também pode evocar o vasoespasmo arterial, e isso pode iniciar o mesmo ciclo vicioso em pacientes com SDCR-II (CODERRE; BENNET, 2010).

Na figura 3 pode-se ver a comparação entre sintomas observados na pata de ratos submetidos ao modelo de DPIC, em relação aos registrados no pé de homens adultos com SDCR-I.

Figura 3 - Comparação entre a pata do animal com DPIC e pé adulto com SDCR-I.



Fonte: Adaptado de Laferrière et al., 2008.

Legenda: a) e b) comparando a pata e um pé normal; c) 5 min pós-IR mostrando hiperemia e edema; d) fase inflamatória da SDCR-I; e) 24 horas pós-IR pele seca e brilhante; f) fase fria da SDCR-I; g) pele da pata contralateral e h) pele ipsilateral da pata do rato 48 horas pós-IR, claramente menos perfundida do que a pele da pata traseira contralateral, comparável a aparência cianótica da fase fria do pé com SDCR-I.

Do ponto de vista do presente estudo, cabe salientar que embora os exercícios físicos sejam clinicamente empregados no tratamento da SDCR-I (SEBASTIN, 2011) com reconhecido benefício clínico nesta condição, os mecanismos pelos quais os exercícios físicos melhoram o quadro permanecem pouco estudados. No entanto, a contribuição de diferentes sistemas endógenos para a eficácia do exercício físico na melhora da dor foi avaliada em outros estudos em humanos ou animais.

O sistema opióide é o sistema mais estudado e que maior evidência possui de sua participação na diminuição da resposta dolorosa induzida pelo exercício. Em estudo realizado por Goldfard (1990) em humanos, os níveis de beta-endorfinas foram medidos no plasma após a realização de exercícios e se verificou uma variação dos níveis das mesmas de acordo com a modalidade de exercício realizado. Por sua vez, Pierce e colaboradores (1993) avaliaram os níveis plasmáticos de endorfinas, antes e após 45 minutos de exercício de alta intensidade; observou-se um aumento significativo nos níveis das mesmas após a prática do

exercício, em comparação com os níveis verificados anteriormente a este. Em animais submetidos a treinamento com exercício por cinco semanas, os níveis de beta-endorfina e meta-enkefalinas também encontraram-se aumentados em áreas do sistema nervoso central envolvidas com a modulação da resposta dolorosa, tais como a substância cinzenta periaquedutal e a medula ventromedial rostral, quando comparados ao grupo de animais sedentários (STAGG et al., 2011). Finalmente, estudos utilizando diferentes modelos animais de dor aguda ou crônica, bem como diferentes intensidades de exercício, sugeriram a participação do sistema opióide na redução da resposta hiperalgésica a partir de duas abordagens que revertem o efeito anti-alodínico produzido pelo exercício. Estas consistiram da utilização de naloxona, um antagonista não seletivo dos receptores opióides, além da adrenalectomia, ou retirada das glândulas adrenais que liberam opióides endógenos, reverterem o efeito antinociceptivo produzido pelo exercício (BEMENT; SLUKA, 2005; MAZZARDO-MARTINS et al., 2010; STAGG et al., 2011).

Outros autores estudaram ainda diferentes abordagens visando ao conhecimento do melhor protocolo para aplicação de exercício em quadros de dor. Bement e Sluka (2005) avaliaram um protocolo de realização de exercício de baixa intensidade por cinco dias em um modelo de dor muscular crônica, verificando que esta prática aumentou o limiar de resposta dos animais para a retirada da pata à estimulação mecânica; cinco dias após o término da realização do exercício, observou-se retorno da hipersensibilidade. Por sua vez, em modelo de ligadura do nervo espinhal, Stagg e colaboradores (2011) avaliaram duas intensidades de caminhada na esteira, observando após a terceira semana que o exercício de maior intensidade diminuiu a hiperalgésia mecânica e térmica somente. Em outro modelo de dor neuropática crônica em ratos, por lesão parcial de nervo periférico, os autores aplicaram um protocolo de exercício de natação (água a 37 °C, 90 min/dia) prolongado; neste estudo, foram necessários entre 18 a 25 dias de natação para atingir a redução da alodínia ao frio e da hiperalgésia térmica (KUPHAL; FIBUCH; TAYLOR, 2007). Por último, o exercício de natação de alta intensidade, realizado por 30 min/dia por cinco dias, também reduziu a resposta nociceptiva (dolorosa) em modelos de dor aguda, sendo este efeito inibido pela administração prévia de PCPA, um antagonista do receptor da serotonina (MAZZARDO-MARTINS et al. 2010).

Este último achado sugere que além do sistema opióide, o sistema serotoninérgico também esteja envolvido da modulação da dor induzida pelo exercício físico. Os principais receptores de adenosina são denominados A₁ e A₂, e podem interagir com diferentes substâncias, sendo que a adenosina atua como agonista endógeno (SAWYNOK; LIU, 2003),

enquanto a cafeína pode atuar como antagonista não-seletivo dos mesmos em doses baixas, inibindo seu efeito antinociceptivo (SAWYNOK, 2010).

Mostrou-se recentemente que durante a acupuntura, outra modalidade amplamente utilizada para tratamento de dor crônica, a inserção e manipulação da agulha levam ao aumento dos níveis teciduais de trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP), monofosfato de adenosina (AMP) e adenosina (ZAHO, 2008). Ainda de acordo com o estudo, a participação da adenosina na ação analgésica causada pela acupuntura é mediada por ativação do receptor tipo A₁, podendo ser bloqueada pelo uso de cafeína. Além da acupuntura, um protocolo duplo-cego foi utilizado para investigar o efeito de 200 mg de cafeína e 200 mg de placebo administrado via oral, sobre a percepção de intensidade e desconforto da dor induzida termicamente no antebraço antes, durante e após Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea (TENS) de alta frequência, de baixa intensidade em 17 indivíduos normais (média 23 anos), observou que a analgesia induzida pela TENS também foi inibida por este tratamento prévio.(MARCHAND; LI; CHAREST, 1995). Goldman e colaboradores (2010) e Zilka (2010) também verificaram que a inibição de enzimas envolvidas na degradação da adenosina potencializa os efeitos da acupuntura, mostrando que a interferência no metabolismo da adenosina pode prolongar o efeito antinociceptivo.

Tais achados chamam atenção para o fato de que uma maior investigação sobre o envolvimento do sistema adenosinérgico na redução da resposta dolorosa induzida pelo exercício deve ser considerado. Apesar do número crescente de dados experimentais relacionando exercício físico e analgesia (ou antinocicepção em animais), o mecanismo pelo qual o exercício promove diminuição da resposta dolorosa permanece para ser elucidado. A contribuição dos opióides endógenos na modulação da dor parece mais clara do que a de outros neurotransmissores, como a serotonina e a adenosina.

2 JUSTIFICATIVA

O uso de modelos animais é a principal ferramenta de estudo de diferentes problemas de saúde, e ao longo do tempo possibilitou o entendimento e a descoberta de tratamentos efetivos para as mesmas em humanos. A SDCR-I é atualmente uma das mais desafiadoras condições de dor nos membros, interferindo diretamente na função física, emocional e social do indivíduo. A neuropatia presente nesta síndrome dificulta muito a realização das atividades de vida diária e interferem na qualidade de vida, levando a morbidade dos pacientes. Quando tratada de forma correta e imediata, ou seja, nos níveis primários de atenção a saúde, evita-se gastos desnecessários com o deslocamento e internações em grandes centros e co-morbidades que podem instalar-se com a permanência em ambiente hospitalar.

O exercício físico é extensivamente prescrito no tratamento de doenças crônicas com o objetivo de reduzir os sintomas como a dor, e pode ser uma medida mais barata para a manutenção da função destes indivíduos. Dentre todas as formas de praticar o exercício físico, o realizado em ambiente aquático é comumente prescrito para pacientes que devem evitar atividades de descarga de peso, tem dificuldade de realizar movimentos contra a gravidade ou com dificuldade de caminhar. Isso inclui pacientes com SDCR-I, que muitas vezes apresentam hipersensibilidade nos pés e dificuldade de movimentação de membros superiores.

Considerando os efeitos positivos encontrados na literatura sobre os efeitos do exercício na diminuição da dor em diferentes modelos animais, principalmente envolvendo o sistema opióide e alguns estudos mostrando uma possível participação do sistema adenosinérgico em outras modalidades terapêuticas, torna-se necessário verificar o envolvimento destes sistemas na indução da analgesia através do exercício de alta intensidade no modelo de SDCR-I. Identificando os sistemas envolvidos na redução da dor através do exercício, pode-se potencializar o seu efeito através do sinergismo com substâncias ou medicamentos ou evitar, de outra forma, a interferência de outras substâncias que podem reduzir o alívio da dor proporcionado pelo exercício, como ingestão diária de café, chás e bebidas contendo cafeína.

Há ainda pouco consenso sobre a modalidade de tratamento mais efetiva na redução da alteração de sensibilidade dolorosa observada nestes indivíduos, gerando redução na segurança para a escolha da melhor intervenção de tratamento pelos profissionais de saúde, bem como baixa resolutividade do problema. A maior investigação sobre os efeitos e mecanismos de ação do exercício físico, pode torná-lo um alvo terapêutico importante na

reabilitação de pacientes, o que fortaleceria a região com recursos para atender demandas regionais quanto a esta doença, gerando uma maior resolutividade do mesmo, o que consiste em responsabilidade social e segurança e satisfação para o usuário, aumento da qualidade de vida dos pacientes e redução de custos relacionados às doenças crônicas na saúde pública.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito anti-alodínico do exercício físico e os mecanismos de ação envolvidos neste efeito, em um modelo pré-clínico de SDCR-I em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar em um modelo pré-clínico de SDCR-I em camundongos:

- A influência do exercício físico de alta intensidade sobre a alodínia mecânica induzida pela IR.
- O envolvimento dos receptores opióides no efeito anti-alodínico induzido pelo exercício físico, através da utilização da naloxona (um antagonista não-seletivo de receptores opióides).
- O envolvimento dos receptores adenosinérgicos no efeito anti-alodínico induzido pelo exercício físico, através da utilização da cafeína (um antagonista não-seletivo de receptores adenosinérgico).
- O envolvimento dos receptores de adenosina A_1 no efeito anti-alodínico induzido pelo exercício físico, através da utilização de DPCPX (antagonista seletivo de receptores A_1 de adenosina).
- O envolvimento dos receptores de adenosina A_{2A} no efeito anti-alodínico induzido pelo exercício físico, através da utilização de ZM241385 (antagonista seletivo de receptores A_{2A} de adenosina).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

O presente estudo teve delineamento experimental, utilizando-se camundongos da espécie *Mus Musculus*, linhagem *Swiss*, machos, com cerca de 30 g, obtidos no Biotério da Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL. Os animais foram mantidos em câmaras individualizadas com temperatura e umidade controladas ($22 \pm 1^\circ\text{C}$, 60 a 80% de umidade), 20 animais por gaiola, em ciclo claro escuro de 12 h, com livre acesso a ração e água filtrada. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) sob o número de protocolo PP00640. Os experimentos foram realizados no laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação, da Universidade Federal de Santa Catarina. Quanto à quantidade de animais, estudos experimentais realizados por Coderre (2004) e Bratti (2011) verificaram que cerca de 40% dos animais submetidos a IR não desenvolvem dor neuropática, avaliada em testes de nocicepção (ativação das vias de dor, ou nociceptivas). Sendo assim, foram submetidos a IR 15 animais por grupo, em um total de 10 grupos experimentais, mais o grupo *sham* (falso-operado), utilizando-se cerca de 160 animais. Este número foi necessário para obtenção de 8-10 animais com dor neuropática

4.2 INDUÇÃO DA LESÃO POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO (IR)

Neste estudo o procedimento de IR foi utilizado para induzir os sintomas que caracterizam a SCDR-I. Para realização da isquemia, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de hidrato de cloral (7%, 0,6 ml/kg) (QUINTÃO et al., 2006). Após a verificação da perda do estado de consciência do animal, por meio do pinçamento da cauda e das pregas interdigitais, foi posicionado um anel elástico com 1,2 mm de diâmetro interno (Elástico Ligadura 000-1237 marca: Uniden) proximal à articulação do tornozelo da pata posterior direita, de modo a fazer um torniquete (BRATTI, 2011). Os animais foram mantidos sob anestesia com reforços de 20% do volume inicial por três horas e então o anel foi cortado permitindo a reperfusão da pata. Após este procedimento de IR, os animais permaneceram próximos a uma lâmpada até retornarem a deambular pela caixa, voltando posteriormente para o biotério da UFSC.

Para comparação dos efeitos causados pelo procedimento de IR, outros animais receberam o mesmo procedimento, exceto que o anel foi cortado, de modo que a pressão foi fracamente exercida sobre o tornozelo dos camundongos não ocluindo o fluxo sanguíneo da

pata traseira direita, sendo estes considerados o grupo de animais *sham*. Nos dias dos experimentos, os animais foram aclimatados ao ambiente de experimentação no Laboratório de Neurobiologia da Dor da UFSC por pelo menos 1h antes dos testes, e foram homoganeamente distribuídos entre os diferentes grupos de tratamento, conforme ilustrado no esquema da Tabela abaixo.

Tabela 3 - Descrição dos grupos de estudos.

Grupo	Lesão por IR	Tratamento	Exercício
Grupo 1 (<i>sham</i>)	não	Veículo (10 ml/Kg, i.p, 7 ^o - 11 ^o PO)	não
Grupo 2	sim	Veículo (10 ml/Kg, i.p, 7 ^o - 11 ^o PO)	não
Grupo 3	sim	Veículo (10 ml/Kg, i.p, 7 ^o - 11 ^o PO)	sim
Grupo 4	sim	Naloxona (1 ml/Kg, i.p, 7 ^o - 11 ^o PO)	não
Grupo 5	sim	Naloxona (1 ml/Kg, i.p, 7 ^o - 11 ^o PO)	sim
Grupo 6	sim	Cafeína (10 ml/Kg, i.p, 7 ^o - 11 ^o PO)	não
Grupo 7	sim	Cafeína (10 mg/Kg, i.p, 7 ^o - 11 ^o PO)	sim
Grupo 8	sim	DPCPX (0,1 mg/Kg, i.p, 7 ^o - 11 ^o PO)	não
Grupo 9	sim	DPCPX (0,1 mg/Kg, via, 7 ^o - 11 ^o PO)	sim
Grupo 10	sim	ZM241385 (3 mg/Kg, i.p, 7 ^o - 11 ^o PO)	não
Grupo 11	sim	ZM241385 (3 mg/Kg, i.p, 7 ^o - 11 ^o PO)	sim

Fonte: Elaboração do autor, 2012.

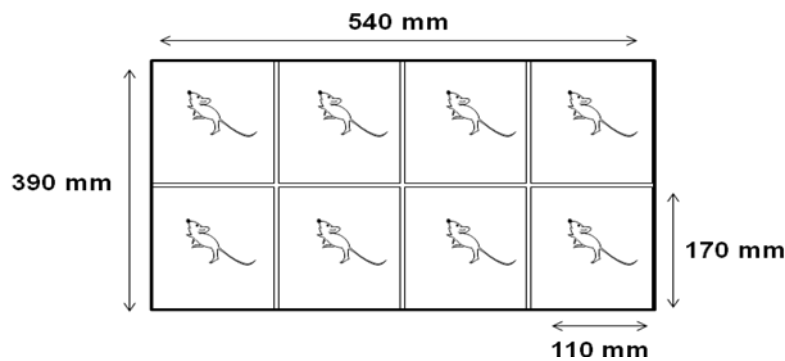
IR: lesão por isquemia-reperfusão.

PO: Pós-Operatório.

4.3 PROTOCOLO DO EXERCÍCIO FÍSICO

Neste estudo, o protocolo de exercício físico utilizado foi o de natação, de alta intensidade, por cinco dias. O domínio fisiológico em relação à intensidade do exercício foi determinado por Mazzardo-Martins et al. (2010) ao avaliar o lactato sanguíneo dos camundongos entre o 10^o e o 30^o minuto de exercício, que verificou que os níveis deste marcador estavam acima da máxima fase estável (1 mmol/L), caracterizando este como um exercício de alta intensidade. Os animais foram colocados em uma caixa plástica contendo aproximadamente 35 litros de água, com dimensões de 540 x 390 x 325 mm, dividida com acrílico, em oito compartimentos de 170 x 110 mm cada (Figura 5). A água foi mantida aquecida a 37°C. Foi acrescentado sabão líquido (1 ml por compartimento, correspondendo a 229 µl/L) para reduzir a tensão superficial da água e evitar o comportamento de ‘boiar’ dos animais. Após cada sessão de natação os animais foram gentilmente secos com toalhas de tecido (MAZZARDO-MARTINS et al., 2010).

Figura 4 - Representação da caixa plástica utilizada para realização do protocolo de exercício físico, de natação de alta intensidade nos camundongos.



Fonte: Mazzardo-Martins, 2010.

Na Tabela 4 descreve-se o protocolo de exercício físico aos quais os animais foram submetidos ao longo dos cinco dias, sendo que no primeiro dia cada animal do grupo exercitado foi submetido a três sessões de natação com duração de 10 minutos de atividade, intercalado com 5 minutos de repouso, totalizando no final 30 minutos de exercício. Do segundo ao quinto dia de exercício, foram realizadas sessões de trinta minutos contínuos, sem repouso.

Tabela 4 - Protocolo de natação de alta intensidade.

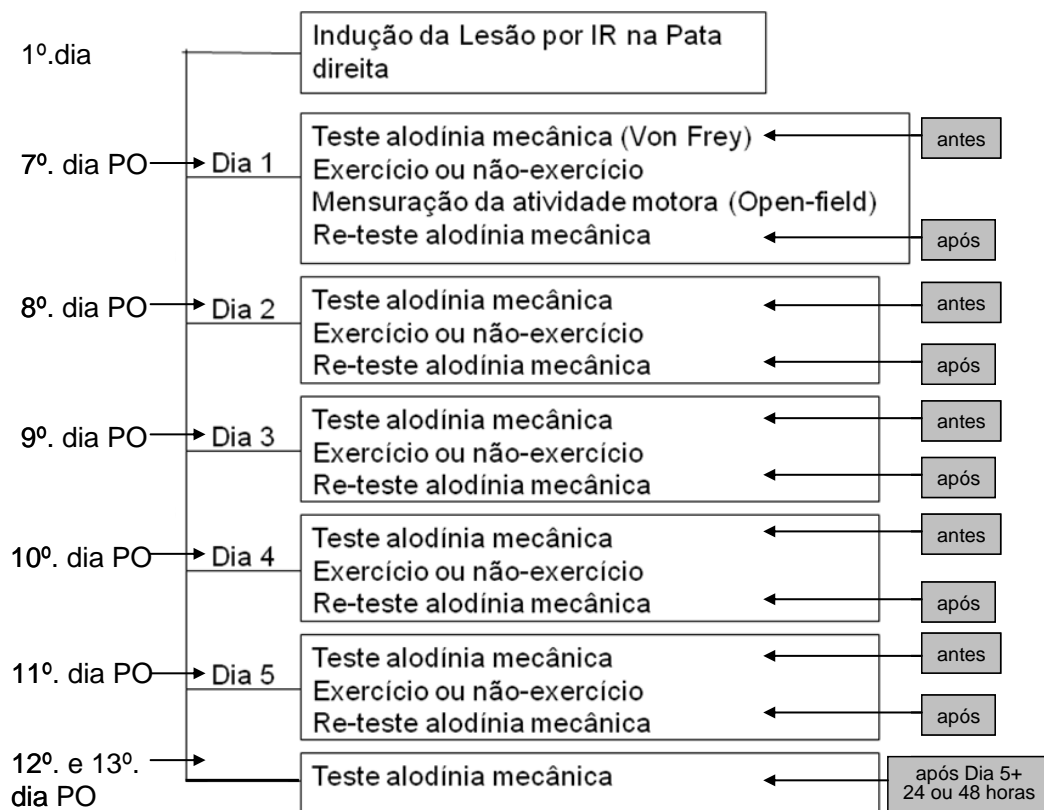
Dias	Duração (min) *	Repouso (min)	No de sessões	Exercício (min)
1	10	5	3	30
2	30	0	1	30
3	30	0	1	30
4	30	0	1	30
5	30	0	1	30

Fonte: Adaptado Mazzardo-Martins et al., 2010

* Equivalente ao tempo de duração do exercício em cada sessão.

O protocolo de natação de alta intensidade iniciou-se no sétimo dia após a lesão por IR, que é caracterizado no modelo da SDCR-I como o período que se inicia a manifestação da dor neuropática (BRATTI, 2011; MILLECAMPS; CODERRE, 2008). Para um melhor entendimento, a Figura 5 abaixo, mostra um esquema do fluxograma adotado para a realização do exercício e dos demais testes.

Figura 5 - Fluxograma dos testes empregados no estudo.



Fonte: Adaptado de Bement; Sluka, 2005.

Legenda= IR: Isquemia-reperfusão. PO: Pós-operatório.

De acordo com a figura 5, pode-se observar que as avaliações e os tratamentos com exercício físico foram iniciados somente no 7º dia após IR. Além disso, nota-se que os testes foram realizados por sete dias, sendo realizados até 48 horas após o Dia 5 (última sessão de natação). Ainda, entre o Dia 1 e o Dia 5 avaliou-se a alodínia mecânica duas vezes ao dia, imediatamente antes da realização do protocolo de exercício físico (antes, teste alodínia mecânica) e 30 minutos após a realização do mesmo (após, re-teste alodínia mecânica).

4.4 AVALIAÇÃO DA ALODÍNIA MECÂNICA

A alodínia mecânica característica da SCDR-I, induzida pelo procedimento de IR, foi avaliada utilizando monofilamentos de nylon, denominado *von Frey* (VFH, Stoelting, Chicago, USA). Foram utilizados como indicativo de resposta os valores percentuais para a frequência de retirada da pata dos animais para 10 aplicações do filamento de *von Frey*, com a força de 0,4 g. Esta pressão foi selecionada para a avaliação de alodínia mecânica, a partir de estudo anterior que observou que esta pressão não causa retirada da pata (nocicepção) em animais do grupo *sham*.

O teste foi aplicado utilizando-se uma plataforma de (70 x 40 cm), que consiste em uma tela de arame com malha de 6 mm, para facilitar a aplicação do filamento na superfície ventral da pata posterior, sendo os animais colocados individualmente em uma câmara de observação feita em acrílico (9 x 7 x 11 cm), sem fundo e coberta com tampa, posicionada sobre a plataforma (Figura 7).

Os critérios para a aplicação do estímulo mecânico foram: a) a aplicação feita perpendicularmente à superfície plantar, com pressão suficiente para proporcionar a curvatura do filamento, obtendo-se assim pressão total; b) os animais foram avaliados quando as quatro patas estavam acomodadas sobre a tela; c) a resposta de retirada foi considerada positiva quando o animal removeu totalmente a pata da tela de apoio.

Figura 6 - Ilustração do procedimento de avaliação da alodínia mecânica com o monofilamento de *von Frey*.



Fonte: Neurodetective. **Mechanical allodynia**. Disponível em: < <http://www.ndineuroscience.com/neurological-disorder-research-pain-inflammation.asp> > Acesso em: 02 de junho de 2012.

4.5 MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA

No Dia 1 (primeiro dia de natação), além da avaliação da alodínia mecânica pelo teste de *von Frey*, realizou-se também a mensuração da atividade locomotora pelo teste do *Open-Field* ou Campo Aberto. A atividade locomotora foi avaliada para excluir qualquer efeito locomotor inespecífico causado pelo exercício ou pelos tratamentos. O aparelho consiste de uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm. O piso da arena é dividido em 12 quadros iguais. No primeiro dia de tratamento, os camundongos que foram submetidos ao protocolo de natação foram avaliados 30 minutos após a natação. Para a realização do teste de campo aberto, os animais foram colocados individualmente no canto esquerdo da caixa de madeira e liberados para explorar livremente a arena. O número de quadrados cruzados com todas as patas (travessia) foi contado em uma sessão de 6 minutos. O aparelho foi higienizado com solução de etanol a 10 % entre os testes para ocultar pistas do animal.

4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A ALODÍNIA MECÂNICA NO MODELO DE SDCR-I.

Para avaliar a possível influência do exercício de natação de alta intensidade sobre a alodínia mecânica induzida pela IR, as respostas à estimulação com os monofilamentos de *von Frey* foram avaliadas, conforme descrito anteriormente, antes da indução da IR (basal),

bem como por 5 dias em animais do grupo que realizou o protocolo de exercício (imediatamente antes e 30 minutos após a realização do exercício físico), sendo suas respostas comparadas às obtidas nos animais do grupo não-exercitado (controle).

Este último grupo foi constituído de animais que foram manuseados nos mesmos dias e horários que os animais exercitados, mas, no entanto, foram colocados na água e imediatamente retirados (30 segundos) e secos com toalhas de tecido, sem a realização dos exercícios.

4.7 AVALIAÇÃO DO POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES OPIÓIDES NO EFEITO ANTI-ALODÍNICO INDUZIDO PELO EXERCÍCIO FÍSICO NO MODELO DE SDCR-I.

Para avaliar a contribuição de opióides endógenos no efeito induzido pela natação de alta intensidade sobre a alodínia mecânica no modelo de SDCR-I, grupos de animais exercitados ou não-exercitados foram tratado diariamente entre o Dia 7 e Dia 11 com naloxona (1 mg/kg, por via i.p., um antagonista não-seletivo dos receptores opióides), 20 minutos antes da natação.

4.8 AVALIAÇÃO DO POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES ADENOSINÉRGICOS NO EFEITO ANTI-ALODÍNICO INDUZIDO PELO EXERCÍCIO FÍSICO NO MODELO DE SDCR-I

Para avaliar a contribuição do sistema adenosinérgico no efeito induzido pela natação de alta intensidade sobre a alodínia mecânica no modelo de SDCR-I, outros animais receberam os seguintes tratamentos. Diferentes grupos de animais exercitados ou não-exercitados foram tratados diariamente entre o Dia 7 e o Dia 11 com cafeína (10 mg/kg, por via i.p., um antagonista não-seletivo de receptores adenosinérgicos), DPCPX (0,1 mg/kg, por via i.p., um antagonista seletivo de receptores A₁ de adenosina) ou ZM241385 (3 mg/kg, por via i.p., um antagonista seletivo de receptores A₂ de adenosina), previamente (20 minutos antes) à realização do protocolo de exercício físico.

4.9 DROGAS E REAGENTES

As seguintes substâncias foram utilizadas: hidrato de cloral (Vetec, São Paulo, Brasil), dimetil sulfoxido (DMSO) (Merck, Darmstadt, Alemanha), cloridrato de naloxona, cafeína (Sigma Chemical Co., EUA), 1,3 – dipropyl-8-cyclopentylxanthine (DPCPX) e 4 – (2-[7-amino-2-(2-furil) [1,2,4] triazolo [2,3-a] [1,3,5] triazin-5-ilamino] etil)-fenol (ZM241385) (Tocris Bioscience, Ellisville, MO) e NaCl. As substâncias foram dissolvidas em solução salina isotônica (NaCl 0,9%) imediatamente antes do uso ou em solução salina com DMSO 5%.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Para análise dos dados comportamentais de alodínia mecânica foi empregada a análise de variância ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de *Bonferroni*, para múltiplas comparações (*Graph Pad Prism for Windows* versão 5.01). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

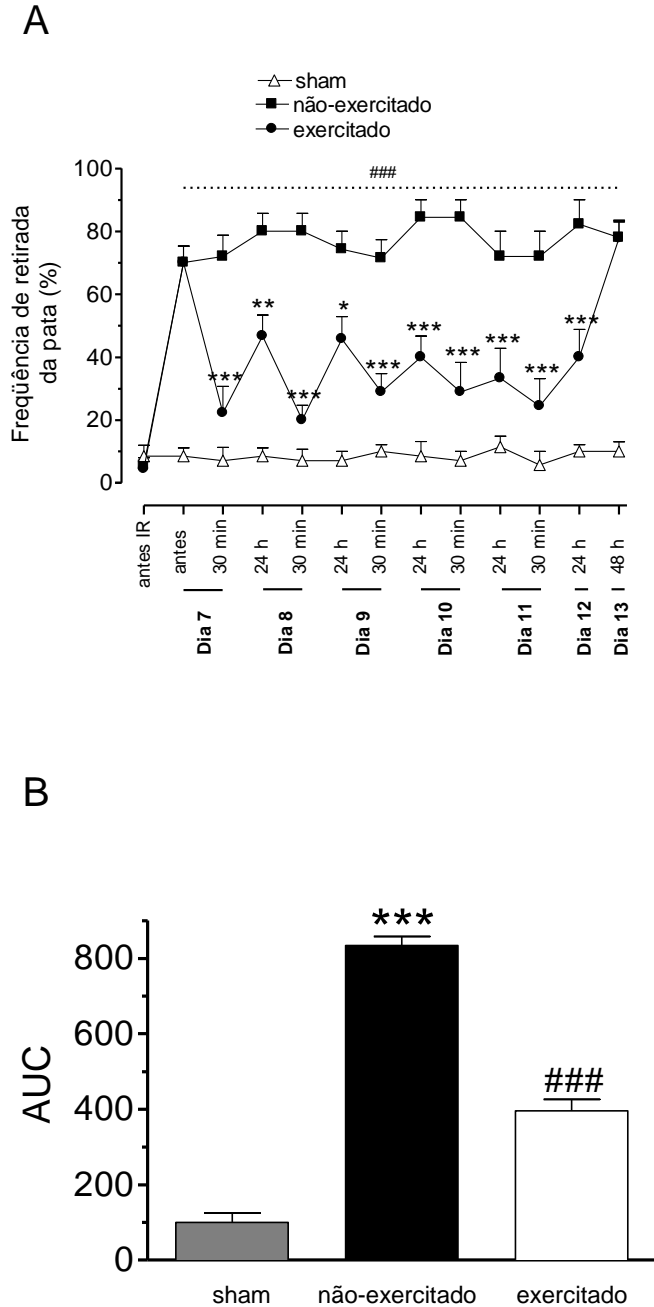
5 RESULTADOS

Ao analisar a figura 7A observa-se que o grupo *sham*, que não sofreu a IR da pata, não mostrou alterações na frequência de retirada da pata no teste de *von Frey* durante todo o período de avaliação do estudo. No entanto, o grupo não-exercitado, sete dias após a IR, apresentou uma diminuição do limiar de resposta ao estímulo sensorial, caracterizada pelo aumento da frequência de retirada da pata ao estímulo mecânico (alodínia). Isto pode ser entendido como um aumento significativo da sensibilidade ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo *Sham*, que se manteve durante todo o período de avaliação do estudo. Por sua vez, o grupo exercitado mostrou uma diminuição significativa da frequência de retirada da pata em relação ao grupo não-exercitado, aos 30 minutos ($p < 0,001$) após a primeira sessão de exercício de alta intensidade na água, sendo que o efeito persistiu até o 12º dia. As seguintes diferenças significativas foram observadas nos respectivos dias e tempos de avaliação: Dia 8 (24 horas após a primeira sessão, $p < 0,01$; 30 min, $p < 0,01$), 9 (24 horas, $p < 0,05$; 30 min, $p < 0,001$) 10 (24 horas, $p < 0,001$; 30 min, $p < 0,001$) 11 (24 horas, $p < 0,001$; 30 min, $p < 0,001$) e 12 (24 horas, $p < 0,001$). Entretanto, 48 horas após o término de realização do protocolo de exercício físico, a alodínia mecânica retornou ao mesmo nível do grupo não-exercitado.

Estes dados podem ser também confirmados pela análise da área sobre a curva (figura 7B), que mostrou uma diminuição do limiar de resposta significativa ($p < 0,001$) do grupo não-exercitado em relação ao grupo *sham*, e o efeito significativo ($p < 0,001$) do exercício na diminuição da alodínia mecânica do grupo exercitado quando comparado com o grupo não-exercitado.

O tratamento diário dos animais, entre os Dias 7 e 11, com naloxona reverteu o efeito anti-alodínico produzido pelo exercício no modelo pré-clínico de SDCR-I. Isto pode ser notado, uma vez que, os animais tratados com naloxona (1mg/kg, i.p.) 20 minutos antes da realização do protocolo de exercício físico, mostraram diferenças significativas dos valores de suas médias quando comparados com os animais que foram pré-tratados com salina e submetidos a natação. No entanto esta reversão do efeito anti-alodínico foi observada somente nas avaliações realizadas 30 minutos após a realização do exercício (após) dia 8 ($p < 0,05$), 9 ($p < 0,001$) e 10 ($p < 0,001$) PO. Para as avaliações realizadas no período antes da prática do exercício físico (antes, ou seja 24 horas após a última sessão de natação), não foi observado efeito da naloxona, não apresentando diferença significativa em relação ao grupo controle (salina + natação) na maioria dos dias analisados (figura 8A).

Figura 7 - Exercício de natação de alta intensidade, repetido por 5 dias, reduz a alodínia mecânica (efeito anti-hipernociceptivo) no modelo animal de SDCR-I.

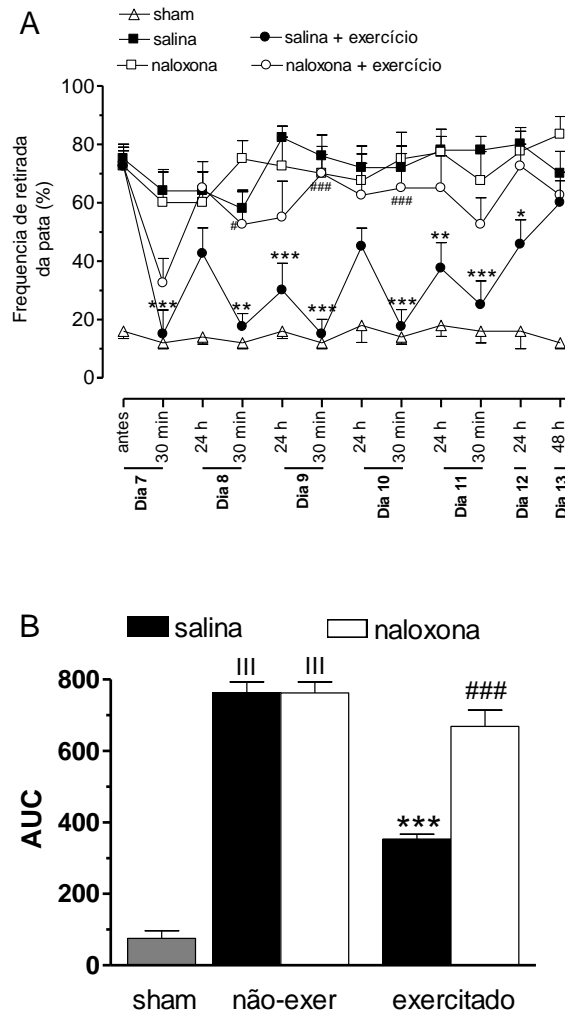


Fonte: Elaboração do autor, 2012.

Legenda: Exercício de natação de alta intensidade, repetido por 5 dias, reduz a alodínia mecânica (efeito anti-alodínico) no modelo animal de SDCR-I. A) Frequência de retirada da pata (%) e B) AUC comparando o grupo *sham*, não-exercitado e exercitado, iniciado 7 dias após a IR. A avaliação foi realizada antes e depois (30 min) de cada sessão de exercício, além de 24 e 48 horas após a última sessão de exercício. Cada coluna representa a média de 8-10 animais, barra de erro em erro padrão da média (E.P.M.). Símbolos denotam o nível de significância: $*p < 0,05$, $**p < 0,05$ ou $***p < 0,001$ em comparação com o grupo não-exercitado; $###p < 0,001$ para comparação do grupo *sham* com o grupo não-exercitado. Foram empregados os testes de ANOVA de duas vias seguido do teste de *Bonferroni* (painel A) ou ANOVA de uma via seguido do teste de *Newman-Keuls* (painel B).

Ao analisar a área sobre a curva para o efeito da naloxona (figura 8B), observa-se um efeito significativo ($p < 0,001$) de redução da alodínia mecânica no grupo exercitado em relação ao não-exercitado. Além disso, a naloxona reverteu o efeito anti-alodínico produzido pelo exercício físico ($p < 0,001$).

Figura 8 - Naloxona reverte o efeito anti-alodínico produzido pelo exercício de alta intensidade no modelo animal de SDCR-I.



Fonte: Elaboração do autor, 2012.

Legenda: Naloxona reverte o efeito anti-alodínico produzido pelo exercício de alta intensidade no modelo animal de SDCR-I. A naloxona (1 mg/kg, i.p.) administrada 20 minutos antes de cada sessão de exercício de alta intensidade, iniciado 7 dias após a IR na pata de camundongos. O efeito anti-alodínico foi avaliado pela resposta dos animais à estimulação mecânica no teste do von Frey, pela frequência de retirada da pata (em %, painel A) ou pela Área Sob a Curva (AUC, painel B), antes e depois (30 min) de cada sessão de exercício, além de 24 e 48 horas após a última sessão de exercício físico. Cada coluna representa a média de 8-10 animais, barra de erro em erro padrão da média (E.P.M.). Símbolos denotam o nível de significância: III $p < 0,001$ quando comparado com o grupo sham; * $p < 0,05$, ** $p < 0,05$ ou *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo não-exercitado; # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ quando comparado com o grupo salina + exercício. Foram empregados os testes de ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni (painel A) ou ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls (painel B).

Com relação à participação do sistema adenosinérgico no efeito anti-alodínico promovido pelo exercício nos animais com IR, na figura 9A observa-se que o tratamento diário com cafeína (10 mg/Kg, i.p.), 20 minutos antes da natacao, reverteu significativamente o efeito anti-alodínico produzido pelo exercício no modelo animal da SDCR-I. Este efeito foi observado do 1°. ao 5°. dia de natação, 30 min após a realização do exercício ($p < 0,01$), bem como do 6°. ao 11°.dia, nas avaliações realizadas 24 horas após o término do exercício físico ($p < 0,05$).

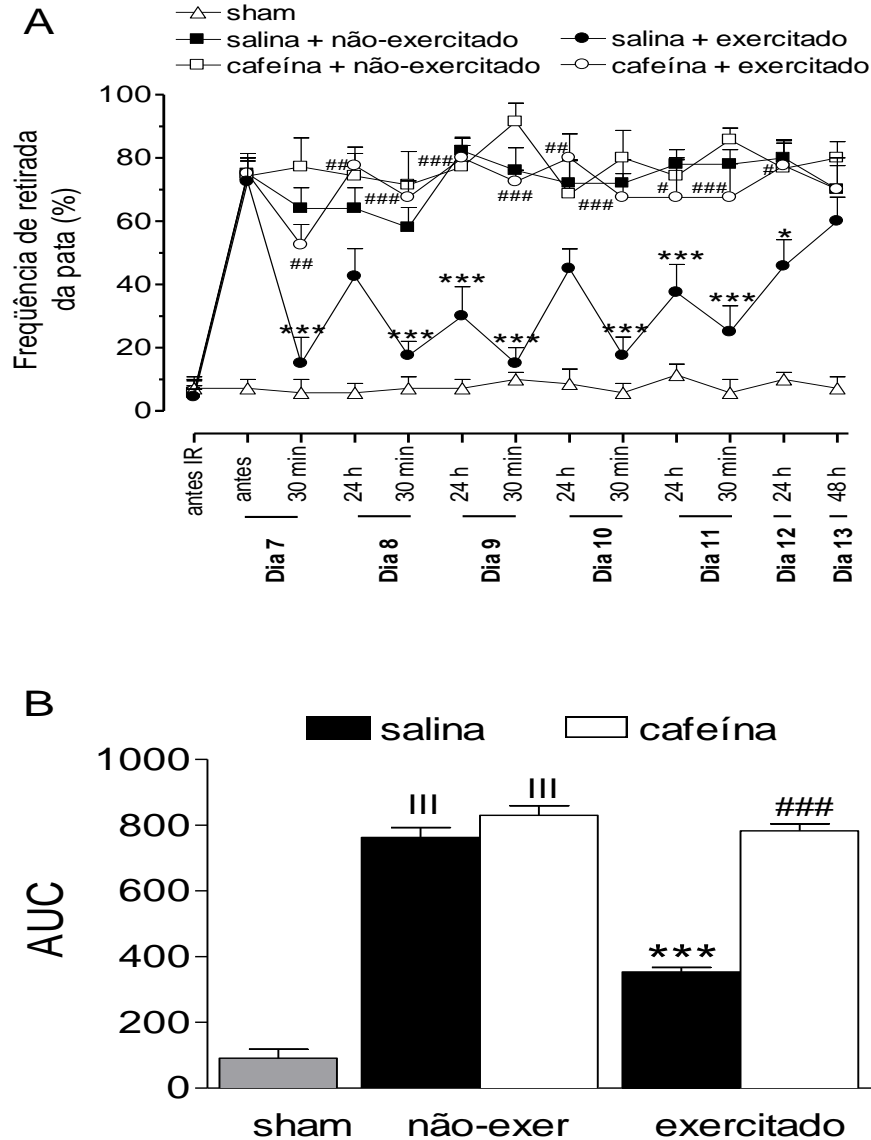
A análise da área sobre a curva mostrou um aumento significativo da alodínia mecânica nos camundongos exercitados que receberam tratamento prévio com cafeína, em comparação com os que receberam salina (Figura 9B). Além disso, a cafeína impediu o efeito anti-alodínico produzido pelo exercício no grupo exercitado.

Como pode ser observado na figura 10A, o tratamento diário com DPCPX (0,1 mg/Kg, i.p.), 20 minutos antes do protocolo do exercício físico, reverteu significativamente o efeito anti-alodínico produzido pelo exercício no modelo de SDCR-I, no dia 7 (30 min, $p < 0,05$), 8 (30min, $p < 0,01$), 11 (24 horas, $p < 0,05$) e 24 horas após o término do protocolo de exercício físico ($p < 0,01$).

Ao analisar a área sobre a curva observa-se uma reversão significativa ($p < 0,001$) no efeito anti-alodínico induzido pelo exercício físico nos camundongos que receberam tratamento prévio com DPCPX e submetidos ao exercício físico, comparado com o grupo salina + exercício (figura 10B).

Por outro lado, o tratamento dos animais com ZM241358 (3 mg/Kg, i.p.), antagonista seletivo de receptores A_2 de adenosina, 20 minutos antes do protocolo do exercício, não reverteu os efeitos anti-alodínico induzidos pelo exercício no modelo de SDCR-I (figura 11A). Em contraste, ao analisarmos a área sobre a curva mostrou uma reversão significativa ($p < 0,05$) da diminuição da alodínia produzida pelo exercício nos camundongos que receberam tratamento prévio com ZM241358 em comparação com o grupo salina + exercício. O ZM241358 reduziu o efeito anti-alodínico induzido pelo exercício físico.

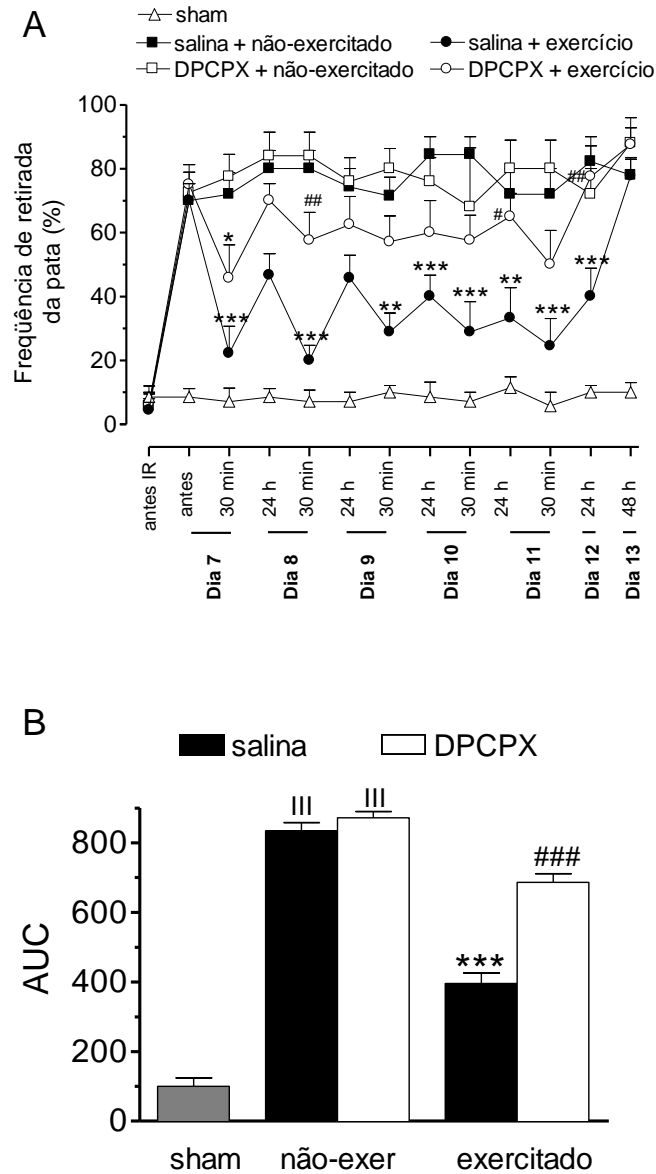
Figura 9 - Cafeína reverte o efeito anti-alodínico produzido pelo exercício de alta intensidade no modelo animal de SDCR-I.



Fonte: Elaboração do autor, 2012.

Legenda: Cafeína reverte o efeito anti-alodínico produzido pelo exercício de alta intensidade no modelo animal de SDCR-I. A cafeína (10 mg/kg, i.p.) administrada 20 minutos antes de cada sessão de exercício de alta intensidade, iniciado 7 dias após a IR na pata de camundongos. O efeito anti-alodínico foi avaliado pela resposta dos animais à estimulação mecânica no teste do von Frey, pela frequência de retirada da pata (em %, painel A) ou pela Área Sobre a Curva (AUC, painel B), antes e depois (30 min) de cada sessão de exercício, além de 24 e 48 horas após a última sessão de exercício. Cada coluna representa a média de 8-10 animais, barra de erro em erro padrão da média (E.P.M.). Símbolos denotam o nível de significância: III $p < 0,001$ quando comparado com o grupo *sham*; * $p < 0,05$ ou *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo não-exercitado; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ quando comparado com o grupo salina + exercício. Foram empregados os testes de ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni (painel A) ou ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls (painel B).

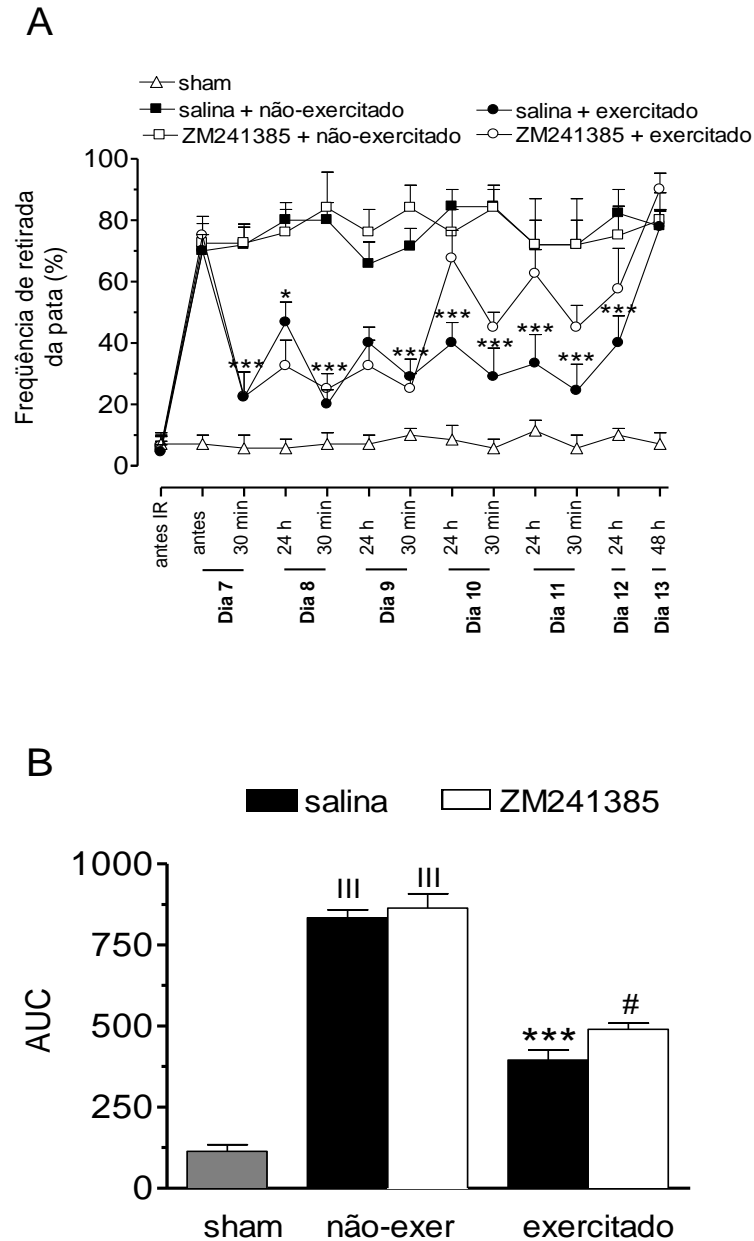
Figura 10 - DPCPX reverte o efeito anti-alodínico produzido pelo exercício de alta intensidade no modelo animal de SDCR-I.



Fonte: Elaboração do autor, 2012.

Legenda: DPCPX reverte o efeito anti-alodínico produzido pelo exercício de alta intensidade no modelo animal de SDCR-I. O DPCPX (0,1 mg/kg, i.p.) foi administrada 20 minutos antes de cada sessão de exercício de alta intensidade, iniciado 7 dias após a IR na pata de camundongos. O efeito anti-alodínico foi avaliado pela resposta dos animais à estimulação mecânica no teste do von Frey, pela frequência de retirada da pata (em %, painel A) ou pela Área Sobre a Curva (AUC, painel B), antes e depois (30 min) de cada sessão de exercício, além de 24 e 48 horas após a última sessão de exercício. Cada coluna representa a média de 8-10 animais, barra de erro em erro padrão da média (E.P.M.). Símbolos denotam o nível de significância: III $p < 0,001$ quando comparado com o grupo *sham*; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ou *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo não-exercitado; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ quando comparado com o grupo salina + exercício. Foram empregados os testes de ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni (painel A) ou ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls (painel B).

Figura 11 - ZM241385 reverte o efeito anti-alodínico produzido pelo exercício de alta intensidade no modelo animal de SDCR-I.



Fonte: Elaboração do autor, 2012.

Legenda: ZM241385 reverte o efeito anti-alodínico produzido pelo exercício de alta intensidade no modelo animal de SDCR-I. O ZM241385 (3 mg/Kg, i.p.) foi administrado 20 minutos antes de cada sessão de exercício de alta intensidade, iniciado 7 dias após a IR na pata de camundongos. O efeito anti-alodínico foi avaliado pela resposta dos animais à estimulação mecânica no teste do von Frey, pela frequência de retirada da pata (em %, painel A) ou pela Área Sobre a Curva (AUC, painel B), antes e depois (30 min) de cada sessão de exercício, além de 24 e 48 horas após a última sessão de exercício. Cada coluna representa a média de 8-10 animais, barra de erro em erro padrão da média (E.P.M.). Símbolos denotam o nível de significância: III $p < 0,001$ quando comparado com o grupo *sham*; (*) $p < 0,05$ ou (***) $p < 0,001$ quando comparado com o grupo não-exercitado; # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo salina + exercício. Foram empregados os testes de ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni (painel A) ou ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls (painel B).

6 DISCUSSÃO

A partir de critérios diagnósticos recentes, a SDCR vem se apresentando com prevalência significativa na população. Sabe-se também que a mesma se manifesta com sintomatologia que promove grande perda da qualidade de vida do indivíduo. Desta forma, a elucidação dos fenômenos compreendidos na fisiopatologia da SDCR-I, bem como a busca por novas alternativas de tratamento constituem-se objetivos extremamente relevantes nesta área.

O papel analgésico do exercício em diferentes condições vem sendo investigado em estudo recentes envolvendo modelos animais de dor inflamatória (KUPHAL et al., 2007), dor muscular crônica (BEMENT; SLUKA, 2005) ou dor neuropática crônica (COBIANCHI et al., 2010). No entanto, a melhor forma de utilização do mesmo, bem como, os mecanismos implicados nesta ação ainda não estão completamente compreendidos. O presente estudo fortalece os dados da literatura por demonstrar que a realização de sessões repetidas de natação de alta intensidade promoveu redução da alodínia mecânica. E além disso, estende estes dados mostrando pela primeira vez que a natação reduz alodínia mecânica em camundongos submetidos a um modelo de SDCR-I induzido pela IR da pata. Interessante, este efeito anti-alodínico do exercício físico revertido pelo pré-tratamento dos animais, com antagonistas para receptores opióides ou adenosinérgicos, sugerindo a contribuição destes dois sistemas endógenos no mecanismo neurobiológico de ação do exercício físico.

A redução da alodínia mecânica promovida pelo exercício, observada pela diminuição da frequência do comportamento de retirada da pata neste modelo que caracteriza a SDCR-I, corrobora com os recentes achados em seres humanos. Tem sido demonstrado em humanos que o exercício físico reduz a dor em pacientes portadores da SDCR-I, principalmente quando realizado de forma intensiva e com alta intensidade, ou ainda associado a outras modalidades fisioterapêuticas (METE-TOPCUOGLU et al., 2010; BROOK; JANSELEWITZ, 2012).

A intensidade e a frequência com que o exercício físico é realizado pode influenciar diretamente nos efeitos por ele produzidos. Com a prática regular de exercício físico, por cinco semanas, observou-se redução da hipersensibilidade mecânica e térmica em modelo de dor neuropática em ratos (STAGG et al., 2011). A realização de exercício de baixa intensidade, por cinco dias, também aumentou o limiar sensorial num modelo de dor muscular crônica (BEMENT; SLUKA, 2005). No presente estudo, a prática de natação foi realizada de maneira regular e intensa. De acordo com trabalho de Pierce e colaboradores (1993) em

humanos, esta forma de exercício pode estar correlacionada à liberação de opióides endógenos, já que ocorre um aumento de β -endorfina plasmática após exercício prolongado de alta intensidade. Dados semelhantes foram registrados num estudo com indivíduos jovens, que realizaram bicicleta ergométrica em diferentes intensidades, onde encontrou correlação entre a intensidade do exercício físico e nível de lactato com a concentração plasmática de β -endorfina (GOLDFARD et al., 1990).

Os achados descritos acima são consistentes com a observação de que no presente estudo o tratamento dos animais com naloxona reverteu o efeito anti-alodínico observado com o exercício físico, mostrando um possível envolvimento do sistema opióide com o efeito anti-alodínico causado pelo exercício físico de alta intensidade. Embora no presente estudo não tenham sido investigados os possíveis sítios da ação antinociceptiva dos opióides endógenos, sabe-se que a administração sistêmica ou intracerebroventricular de antagonista opióide reverte o efeito do exercício sobre a hipersensibilidade mecânica em modelo de dor neuropática em ratos (STAGG et al., 2011). Mazzardo-Martins e colaboradores (2010) verificaram que o efeito anti-hipernociceptivo gerado pelo exercício de natação de alta intensidade foi prevenido pela administração sistêmica de naloxona e pela adrenalectomia bilateral de camundongos, indicando que a liberação periférica dos opióides pelas glândulas adrenais podem participar deste efeito.

A participação do sistema opióide endógeno para o efeito do exercício observado, também é consistente com o dado de tempo de duração do mesmo no presente estudo. A duração desta ação por até 24 horas após a realização da última sessão de natação pode estar relacionada com a queda rápida da endorfina no líquido céfalo-raquidiano, conforme o que foi sugerido em outros estudos (HOFFMANN; TERENIUS; THOREN, 1990; STAGG et al., 2011). Além disso, o tempo para avaliação da alodínia mecânica aqui selecionado (aos 30 min e 24 horas após o exercício) e a utilização de água aquecida descartam uma possível ação antinociceptiva provocada por corticosteróides endógenos liberados por estresse (KUPHAL; FIBUCH; TAYLOR, 2007; MAZZARDO-MARTINS et al., 2010). Ainda, a inespecificidade do efeito do exercício ou de outros tratamentos também pode ser descartada, já que os resultados obtidos pela mensuração da atividade locomotora dos animais do grupo exercitado e não-exercitado não diferiram, semelhantemente ao que foi observado por Mazzardo-Martins e colegas (2010).

Da mesma forma, a especificidade dos efeitos de antagonistas de receptores adenosinérgicos encontrados no presente estudo, conforme discutido a seguir, também parece efetiva. O ATP é liberado em resposta a exercícios de alta intensidade e atua como um

transmissor que se liga a receptores purinérgicos, incluindo P_{2X} e P_{2Y} (ABBRACCHIO et al, 2009;. BURNSTOCK, 2007). Este neurotransmissor não pode ser transportado de volta para dentro da célula, mas em vez disso, é rapidamente degradado à adenosina por várias ectonucleotidases antes de sua recaptação (BURNSTOCK, 2007). Adenosina, por sua vez, pode atuar como um agente analgésico que suprime a dor por meio da ativação de proteínas G inibitórias acopladas aos receptores A_1 para adenosina (MAIONE et al, 2007; SJÖLUND; SEGERDAHL; SOLLEVI, 1999). Tal fato torna-se relevante se considerarmos que a cafeína, amplamente consumida pelo homem, possui várias das propriedades psicoativas que fundamentam seu uso comum relacionadas ao bloqueio destes receptores (FREDHOLM et al., 1999). Neste sentido, alguns estudos já demonstraram que outras modalidades de tratamentos para a dor aguda e crônica, como a acupuntura, também tiveram seus efeitos inibidos pela ingestão de cafeína, mesmo em pequenas doses (GOLDMAN et al., 2010; MARCHAND; CHAREST, 1995).

Os resultados do presente estudo demonstram pela primeira vez o envolvimento dos receptores A_1 , sobre o efeito anti-alodínico do exercício físico, uma vez que os receptores A_1 se encontram amplamente distribuídos pelo sistema periférico, na medula espinhal e em estrutura supra-espinhal (SAWYNOK, 1998), parece razoável considerar que substâncias ou procedimentos empregados no tratamento da dor (tal como o exercício físico) possam atuar neste diferentes sítios. Assim, no presente trabalho o antagonista de receptores A_1 , DPCPX, foi capaz de reverter o efeito anti-alodínico induzido pelo exercício físico, relacionando o mesmo ao efeito do exercício físico em animais e sugerindo que sua ativação seja importante para a obtenção dos benefícios clínicos da atividade física regular e de alta intensidade.

O papel dos agonistas de receptores A_{2A} sobre a nocicepção parece mais controverso, sendo estes relacionados tanto com funções pronociceptivas quanto antinociceptivas. Embora a ativação dos mesmos tenha causado aumento da hiperalgesia mecânica em modelo de inflamação induzida por carragenina em camundongos (LI et al., 2010), em outros estudos os agonistas para receptores A_{2A} produziram antinocicepção em modelos de dor nociceptiva, inflamatória ou neuropática (LEE;YAKSH, 1996; POON e SAWYNOK, 1998;. SUH; SONG; KIM, 1997). Estes dados são consistentes com a literatura recente, que demonstraram que os receptores A_{2A} : a) estão presentes na substância gelatinosa, uma região da medula espinhal envolvida com a modulação da transmissão dolorosa (GUNTZ et al., 2008); b) estão relacionados a um papel imunossupressor (HASKO; CRONSTEIN, 2004); c) pertencem à família de receptores acoplados à proteína-G, que estimulam a atividade da ciclase de adenil e aumentam a produção de AMP cíclico, podendo estarem

envolvidos em uma ampla variedade de respostas fisiológicas (HASKO; PACHER, 2007). No presente estudo, a análise de duas vias não demonstrou diferença significativa ao longo dos 5 dias de tratamento. No entanto, somente a análise de área sob a curva revelou um efeito do antagonista dos receptores A_{2A} (ZM241385), sobre o efeito anti-alodínico do exercício físico. Assim, sugere-se para futuros estudos que seja avaliado o papel do receptores A_{2A} sobre diferentes protocolos de exercício físico, afim de confirmar ou definitivamente refutar a premissa que a ativação deste receptor seja necessária para promover o efeito analgésico do exercício físico.

Juntos, os resultados demonstram que a prática de exercícios físico regular e de alta intensidade reduz a dor neuropática e, de forma semelhante ao que se observa para adenosina e inosina, este efeito é dependente da ativação de receptores adenosinérgicos dos tipos A_1 . Está bem estabelecido que o exercício físico dinâmico produz alterações nos peptídeos endógenos, no transporte de aminoácidos pela barreira hematoencefálica e alterações de neurotransmissão (COTMAN; BERCHTOLD; CHRISTIE, 2007; IDE; HORN; SECHER, 1999). O exercício de alta intensidade aumenta a taxa de demanda de metabólito pela sua disponibilidade com uma produção acompanhada de AMP. Além disso, as concentrações de adenosina e de inosina estão significantemente aumentadas no cérebro de ratos após a prática de exercício de alta-intensidade, em relação à prática de exercício moderado (DWORAK et al., 2007). Durante o exercício de alta intensidade, a taxa de utilização de ATP no músculo esquelético é maior do que a taxa de produção do mesmo, o que leva ao aumento de ADP e AMP. Para evitar um amplo acúmulo de AMP dentro da célula, o AMP é desaminado a monofosfato de inosina (IMP) e amônia pela enzima deaminase (LOWENSTEIN, 1990). Uma fração de IMP formado durante o exercício é degradado a inosina e hipoxantina, que passa pelas membranas celulares (HELLSTEN, 1994).

No músculo esquelético, a adenosina é formada a partir do AMP por ação de 5-nucleotidases. Assim, a formação de adenosina poderia ser estimulada tanto por um aumento da concentração do substrato AMP ou por ativação de 5-nucleotidases (ARCH; NEWSHOLME, 1978). A razão entre a demanda e o fornecimento de oxigênio diminui durante a contração muscular, o que pode limitar a resíntese aeróbica de ATP, e levar à quebra da cascata de conversão de ATP a adenosina (DOBSON; RUBIO; BERNE, 1971). Por outro lado, embora a adenosina contribua para a vasodilatação do músculo esquelético durante a hipóxia sistêmica (NEYLON; MARSHALL, 1991), a liberação de adenosina é aumentada frente à exposição de lactato nas células musculares (MO; BALLARD, 2000). Mazzardo-Martins e colaboradores (2010) demonstraram previamente que o exercício de alta-

intensidade por 30 minutos induz um aumento dos níveis sanguíneos de lactato ao final do último dia do mesmo protocolo de exercício empregado no presente estudo. Em vista disto, pode-se especular que este protocolo de exercício, pelo aumento de lactato sanguíneo, possa também estar associado ao aumento das concentrações extracelulares de adenosina e promover a ativação de receptores A_1 .

Uma limitação do presente estudo foi o fato que não mensurou-se os níveis sanguíneos de adenosina ou inosina nos animais submetidos ao exercício físico. Outros estudos avaliaram tal aspecto e determinaram as concentrações de nucleotídeos ou nucleosídeos (ATP, ADP, AMP, adenosina e inosina) durante e após a prática do exercício para confirmar nossa hipótese. Além disso, novas investigações são necessárias para determinar se a adenosina ou a inosina são responsáveis pela ativação dos receptores adenosinérgicos que causam analgesia induzida pelo exercício físico.

Estudos clínicos e a experiência clínica sugerem que o exercício diminui os sintomas dolorosos e melhoram a função em pacientes com dor crônica, incluindo aqueles com dor com componente inflamatório ou neuropático. Contudo, poucos estudos avaliaram o mecanismo implícito nesta ação. O presente estudo confirmou os dados da literatura por demonstrar o envolvimento dos receptores opióides neste efeito. Além disso, demonstrou-se, ao que tudo indica pela primeira vez, que a analgesia induzida pelo exercício está relacionada à ativação de receptores A_1 .

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstraram que o exercício físico de alta intensidade (natação) reduz a alodínia em um modelo de SDCR-I induzido por IR em camundongos. Isto sugere o benefício da prática de atividade física no tratamento desta condição.

Este efeito promovido pelo exercício físico em camundongos envolve a participação dos sistemas opioidérgico e adenosinérgico endógenos; neste último caso, envolvendo principalmente receptores do tipo A_1 . Novos estudos são encorajados no sentido de confirmar a contribuição de receptores adenosinérgicos do tipo A_{2A} nesta ação.

Como perspectiva, sugere-se que novos estudos, incluindo ensaios clínicos, sejam conduzidos no sentido de investigar a ideia do uso controlado de exercício físico, ou seja, regular, de alta intensidade e em ambiente aquático, como uma terapia adjuvante para o tratamento da SDCR-I.

REFERÊNCIAS

- ABBACCHIO, M. P. et al. Purinergic signaling in the nervous system: an overview. **Trends in Neuroscience**, Amsterdam, v. 31, p. 19-29, 2009. Jan. 2009.
- ALLEN, G.; GALER B. S.; SCHWARTZ L. Epidemiology of complex regional pain syndrome: a retrospective chart review of 134 patients. **Pain**, Amsterdam, v. 80, n. 3, p. 539-544, Apr. 1999.
- ARCH, J. R; NEWSHOLME E. A. Activities and properties of 5'-nucleotidase, adenosine kinase and adenosine deaminase in tissues from vertebrates and invertebrates in relation to the control of the concentration and physiological role of adenosine. **The Biochemical journal**, London, v. 174, n. 3, p. 965-977, Sep. 1978.
- BEERTHUIZEN, A. et al. Demographic and medical parameters in the development of complex regional pain syndrome type 1 (CRPS1): Prospective study on 596 patients with a fracture. **Pain**, Amsterdam, v. 153, n. 6, p. 1187-1192, Jun. 2012.
- BEMENT, M.K.H.; SLUKA K.A. Low-Intensity exercise reverses chronic muscle pain in the rat in a naloxone-dependent manner. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, Chicago, v. 86, n. 9, p. 1736-1740, Sep. 2005.
- BRATTI, T. **Caracterização comportamental, bioquímica e farmacológica e efeito da natação sobre o modelo experimental da síndrome da dor complexa regional tipo I em camundongos**. 2011. 102 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências)-Universidade Federal de Santa Catarina; Florianópolis, 2011.
- BROOKE, V.; JANSELEWITZ S. Outcomes of children with complex regional pain syndrome after intensive inpatient rehabilitation. **PM & R : the journal of injury, function, and rehabilitation**, New York, v. 4, n. 5, p. 349-354, May 2012.
- BRUEHL, S. An update on the pathophysiology of complex regional pain syndrome. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 113, n. 3, p. 713-725, Sep. 2010.
- BRUEHL, S. et al. Complex regional pain syndrome: are there distinct subtypes and sequential stages of the syndrome? **Pain**, Amsterdam, v. 95, n. 1-2, p. 119-124, Jan. 2002.
- BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiological reviews**, Washington, v. 87, n. 2, p. 659-797, Apr. 2007.
- CHOI, Y.S. et al. Epidemiology of complex regional pain syndrome: a retrospective chart review of 150 korean patients. **Journal of Korean medical science**, Seoul, v. 23, n. 5, p. 772-775, Oct. 2008.
- COBIANCHI, S. et al. Short- but not long-lasting treadmill running reduces allodynia and improves functional recovery after peripheral nerve injury. **Neuroscience**, Oxford, v. 168, p. 273-287, Jun. 2010.

CODERRE, T. J. Complex regional pain syndrome: what's in a name? **The journal of pain** : official journal of the American Pain Society, Philadelphia, v. 12, p. 2-12, Jan. 2011

CODERRE, T. J.; BENNETT, G. J. A hypothesis for the cause of complex regional pain syndrome-type I (reflex sympathetic dystrophy): pain due to deep-tissue microvascular pathology. **Pain medicine** : the official journal of the American Academy of Pain Medicine, Malden, v. 11, n. 8, p. 1224-1238, Aug. 2010.

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

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

DALY, A. E.; BIALOCERKOWSKI, A. E. Does evidence support physiotherapy management of adult Complex Regional Pain Syndrome Type One? A systematic review. **European journal of pain**, London, v. 13, n. 4, p. 339-353, Apr. 2009.

DOBSON, J. G. Jr.; RUBIO, R.; BERNE, R. M. Role of adenine nucleotides, adenosine, and inorganic phosphate in the regulation of skeletal muscle blood flow. **Circulation research**, Baltimore, v. 29, n. 4, p. 375-384, Oct. 1971.

DWORAK, M. et al. Intensive exercise increases adenosine concentrations in rat brain: implications for a homeostatic sleep drive. **Neuroscience**, Oxford, v. 150, n. 4, p. 789-795, Dec. 2007.

DE MOS, M. et al. The incidence of complex regional pain syndrome: a population-based study. **Pain**, Amsterdam, v. 129, p. 12-20, May 2007.

DE ROOIJ, A. M. et al. Spontaneous onset of complex regional pain syndrome. **European journal of pain**, London, v. 14, n. 5, p. 510-513, May, 2010.

EVCIK, D. et al. Effectiveness of aquatic therapy in the treatment of fibromyalgia syndrome: a randomized controlled open study. **Rheumatology international**, Berlin, v. 28, n. 9, p. 885-890, Jul. 2008.

EVERSDE, L. et al. A pragmatic randomized controlled trial of hydrotherapy and land exercises on overall well being and quality of life in rheumatoid arthritis. **BMC musculoskeletal disorders**, London, p. 8-23, Mar. 2007.

FELIU, M.H.; EDWARDS, C. L. Psychologic factors in the development of complex regional pain syndrome: history, myth, and evidence. **The Clinical journal of pain**, New York, v. 26, n. 3, p. 258-263, Mar/Apr. 2010.

FREDHOLM, B. B. et al. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacological reviews**, Baltimore, v. 51, p. 83-133, Mar. 1999.

- GOLDFARD, A. H. et al.. Plasma beta-endorphin concentration: response to intensity and duration of exercise. **Medicine and science in sports and exercise**, Madison, v. 22, n. 2, p. 241-244, Apr. 1990.
- GOLDMAN, N. et al. Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture. **Nature neuroscience**, New York, v. 13, n. 7, p. 883-888, Jul. 2010.
- GUO, T. Z. et al. Substance P signaling contributes to the vascular and nociceptive abnormalities observed in a tibial fracture rat model of complex regional pain syndrome type I. **Pain**, Amsterdam, v. 108, n. 1-2, p. 95-107, Mar. 2004.
- GUNTZ, E. et al. Expression of adenosine A2A receptors in the rat lumbar spinal cord and implications in the modulation of N-methyl-d-aspartate receptor currents. **Anesthesia and analgesia**, Cleveland, v. 106, n. 6, p. 1882-1889, Jun. 2008.
- HASKÓ, G.; CRONSTEI, B. N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **Trends in immunology**, Oxford, v. 25, p. 33-39, Jan. 2004.
- HASKÓ, G.; PACHER, P. A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. **Journal of leukocyte biology**, New York, v. 83, n. 3, p. 447-455, Mar. 2008.
- HELLSTEN, Y. Xantine dehydrogenase and purine metabolism in man. With special reference to exercise. **Acta physiologica Scandinavica. Supplementum**, Stockholm, v. 621, p. 1-73, 1994.
- HOFFMANN, P.; TERENIUS, L.; THORÉN, P. Cerebrospinal fluid immunoreactive beta-endorfina concentration is increased by voluntary exercise in the spontaneously hypertensive rat. **Regulatory peptides**, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 233-239, Apr. 1990.
- IDE, K.;HORN, A.; SECHER, N.H. Cerebral metabolic response to submaximal exercise. **Journal of applied physiology**, Washington, v. 87, n. 5, p. 1604-1608, nov. 1999.
- KOLTYN, K.F. Analgesia following exercise: a review. **Sports medicine**, Auckland, v. 29, n. 2, p. 85-98, Feb. 2000.
- KUPHAL, K.E.; FIBUCH, E.E.; TAYLOR, B.K. Extended swimming exercise reduces inflammatory and peripheral neuropathic pain in rodents. **The journal of pain** : official journal of the American Pain Society, Philadelphia, v. 8, n. 12, p. 989-997, Dec. 2007.
- LAFERRIÈRE A. et al. Cutaneous tactile allodynia associated with microvascular dysfunction in muscle. **Molecular pain**, London, p. 4-49, Oct. 2008.
- LEE, Y. W; YAKSH, T. L. Pharmacology of the spinal adenosine receptor which mediates the antiallodynic action of intrathecal adenosine agonists. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, Baltimore, v. 277, n. 33, p. 1642-1648, Jun. 1996.
- LOWENSTEIN, J.M. The purine nucleotide cycle revisited. **International journal of sports medicine**, Stuttgart, v. 11, n. 2, p. 37-46, May 1990.

LI, L. et al. Peripheral adenosine A2A receptors are involved in carrageenan-induced mechanical hyperalgesia in mice. **Neuroscience**, Oxford, v. 170, n. 3, p. 923-928, Oct. 2010.

MAIHÖFNER, C; SEIFERT, F.; MARKOVIC, K. Complex regional pain syndromes: new pathophysiological concepts and therapies. **European journal of neurology**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 649-660, May 2010.

MAIONE, S. The antinociceptive effect of 2-chloro-2'-C-methyl-N6-cyclopentyladenosine (2'-Me-CCPA), a highly selective adenosine A1 receptor agonist, in the rat. **Pain**, Amsterdam, v. 131, n. 3, p. 281-292, Oct. 2007.

MARCHAND, S.; LI, J.; CHAREST, J. Effects of caffeine on nalgesia from transcutaneous electrical nerve stimulation. **The New England journal of medicine**, Boston, v. 333, n. 5, p. 325-326, Aug. 1995.

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

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

METE-TOPCUOGLU, A. et al. The effect of upper extremity aerobic exercise in complex regional pain syndrome type I: randomized controlled study in subacute stroke. **European Journal of Pain**, London, p. 47-146, 2010.

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

MO, F. M; BALLARD, H. J. The effect of lactic acid on intracellular pH and adenosine output from superfused rat soleus muscle fibres. **Life sciences**, Oxford, v. 67, n. 3, p. 227-234, Jun. 2000.

NEURODETECTIVE. **Mechanical allodynia**. Disponível em: <
<http://www.ndineuroscience.com/neurological-disorder-research-pain-inflammation.asp>>
Acesso em: 02 de junho de 2012.

NEYLON M.; MARSHALL, J. M. The role of adenosine in the respiratory and cardiovascular response to systemic hypoxia in the rat. **The Journal of physiology**, London, v. 440, p. 529-545, 1991.

PIERCE, E.F. et al. B-endorphin response to endurance exercise: relationship to exercise dependence. **Perceptual and motor skills**, Louisville, v.77, p. 167-170, Dec. 1993.

POON, A.; SAWYNOK, J. Antinociception by adenosine analogs and inhibitors of adenosine metabolism in an inflammatory thermal hyperalgesia model in the rat. **Pain**, Amsterdam, v. 74, n. 2-3, p. 235-245, Feb. 1998.

QUINTÃO, N. L. et al. Long-lasting neuropathic pain induced by brachial plexus injury in mice: role triggered by the pro-inflammatory cytokine, tumour necrosis factor alpha. **Neuropharmacology**, Oxford, v. 50, n. 5, p. 614-620, Apr. 2006.

SANDRONI, P. et al. Complex regional pain syndrome type I: incidence and prevalence in Olmsted county, a population-based study. **Pain**, Amsterdam, v. 103, n. 1-2, p. 199-207, May 2003.

SAVAS, S. et al. The effect of sequel symptoms and signs of complex regional pain syndrome type 1 on upper extremity disability and quality of life. **Rheumatology international**, Berlin, v. 29, n. 5, p. 545-550, Mar. 2009 .

SAYWYNOK, J. Adenosine receptor activation and nociception. **European journal of pharmacology**, Amsterdam, v. 347, p. 1-11, Apr. 1998.

_____. Caffeine and pain. **Pain**, Amsterdam, v. 152, n. 4, p. 726-729, Apr. 2010.

SAWYNOK, J.; LIU, X. J. Adenosine in the cord and periphery: release and regulation of pain. **Progress in neurobiology**, New York, v. 69, n. 5, p. 313-340, Apr. 2003.

SEBASTIN, S. J. Complex regional pain syndrome. **Indian journal of plastic surgery** : official publication of the Association of Plastic Surgeons of India, Varanasi, v. 44, n. 2, p. 298-307, May/Aug. 2011.

SJOLUND, K. F.; SEGERDAHL, M.; SOLLEVI, A. Adenosine reduces secondary hyperalgesia in two human models of cutaneous inflammatory pain. **Anesthesia and analgesia**, Cleveland, v. 88, n. 3, p. 605-610, Mar. 1999.

STAGG, N.J. et al. Regular exercise reverses sensory hypersensitivity in a rat neuropathic pain model. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 114, n. 4, p. 940-948, Apr. 2011.

STANTON-HICKS, M. et al. Reflex sympathetic dystrophy: changing concepts and taxonomy. **Pain**, Amsterdam, v. 63, p. 127-133, Oct. 1995.

SUH, H. W; SONG, DK; KIM, Y. H. Differential effects of adenosine receptor antagonists injected intrathecally on antinociception induced by morphine and beta-endorphin administered intracerebroventricularly in the mouse. **Neuropeptides**, Edinburgh, v. 31, n. 4, p. 339-344, Aug. 1997.

TAN, E. C. et al. Quality of life in adults with childhood-onset of Complex Regional Pain Syndrome type I. **Injury**, Bristol, v. 40, n. 8, p. 901-904, Aug. 2009.

VAN EIJS, F. et al. Evidence-based interventional pain medicine according to clinical diagnoses. 16. Complex regional pain syndrome. **Pain practice** : the official journal of World Institute of Pain, Malden, v. 11, p. 70-87, Jan/Feb. 2011.

VELDMAN, P.H. et al. Signs of reflex sympathetic dystrophy: prospective study of 829 patients. **Lancet**, London, v. 3429, n. 8878, p. 1012-1016, Oct. 1993.

ZAHN, P. K. et al. Adenosine A1 but not A2a receptor agonist reduces hyperalgesia caused by a surgical incision in rats: a pertussis toxin-sensitive G protein-dependent process. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 107, n. 5, p. 797-806, Nov. 2007.

ZHAO, Z. Q. Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. **Progress in neurobiology**, New York, v. 85, n. 4, p. 355-375, Aug. 2008.

ZYLKA, M. J. Needling adenosine receptors for pain relief. **Nature neuroscience**, New York, v. 13, n. 7, p. 783-784, Jul. 2010.