

LEIDIANE MAZZARDO MARTINS

**EXERCÍCIO FÍSICO DE ALTA INTENSIDADE INDUZ HIPONOCICEPÇÃO
VISCERAL EM CAMUNDONGOS: EVIDÊNCIA PARA O ENVOLVIMENTO DE
OPIÓIDES ENDÓGENOS E SEROTONINA**

Florianópolis

2010

LEIDIANE MAZZARDO MARTINS

**EXERCÍCIO FÍSICO DE ALTA INTENSIDADE INDUZ HIPONOCICEPÇÃO
VISCERAL EM CAMUNDONGOS: EVIDÊNCIA PARA O ENVOLVIMENTO DE
OPIÓIDES ENDÓGENOS E SEROTONINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Florianópolis

2010

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida.

Aos meus pais e irmãos pelo incentivo e pelas oportunidades.

Ao meu esposo Daniel que prestou grande auxílio para a realização deste trabalho, sempre com seu bom humor e seu coração de ouro... Obrigada pelos ensinamentos e exemplos.

Ao professor Dr. Adair Roberto Soares dos Santos, por proporcionar momentos impagáveis de conhecimento e pela pessoa maravilhosa que é. E acima de tudo por ter acreditado em mim e me dado essa oportunidade única de estudar nesta Universidade da qual tenho muito orgulho.

Aos meus amigos, que na sua maioria, são integrantes do laboratório: Vinícius, Daniela, Frã, Tati, Marina, Ney, Serginho, Nayara, Alisson, Rodrigo, Débora, Cris Baggio, Cris Setim, Chico, Wladimir, Morgana, Vanessa, Gaúcho, Luana, Marciele, Fer, Deisy.

Aos funcionários desta Universidade em especial o seu Carlinhos, sempre pronto a nos auxiliar, inclusive arrumando o gás esquentar a água que os animais nadaram, valeu seu Carlos!!! E também a Dona Vilma por suas descontraídas conversas na cozinha.

Aos animais que são nossa ferramenta de trabalho.

A todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

RESUMO

Exercício físico é toda atividade física planejada, estruturada e repetitiva que tem por objetivo a melhora ou manutenção da aptidão física. Atualmente sabe-se que a prática de exercícios físicos exerce benefícios tanto para a saúde física, como mental; além disso, ele é capaz de auxiliar no controle de algumas condições dolorosas. Ainda é desconhecido se há uma intensidade específica de exercício necessária para produzir hiponocicepção, bem como os mecanismos envolvidos neste efeito. Para responder a estas questões foi avaliada a influência de 5 dias de natação (30 min/dia, água a 37°C) sobre o limiar nociceptivo de camundongos *Swiss* machos no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (0,6%, i.p.). Inicialmente foi avaliada a resposta nociceptiva de dois grupos controles: (1) (não-exercitado) submetidos a 30 segundos de nado/dia e (2) (não-exercitado) submetidos a 30 minutos de permanência na água rasa aquecida, estes grupos apresentaram respostas nociceptivas similares. Nos experimentos subseqüentes foi utilizado somente o grupo controle 1. Os animais exercitados apresentaram inibição de 44±3% do número das contorções abdominais quando comparados ao grupo controle 1 (não-exercitado, 30s/dia). Através do nível de lactato sanguíneo foi demonstrado que o domínio, em relação à intensidade de esforço, foi severo neste protocolo de natação. Em seguida foi avaliado o decurso temporal da hiponocicepção induzida pela natação, a mesma mostrou-se efetiva na diminuição da nocicepção visceral 12h e 24h após o exercício, com inibições de 43±10 e 45±4%, respectivamente. Foi evidenciada a participação do sistema opióide e da glândula adrenal na atividade hiponociceptiva do nado, pois: a naloxona (1mg/kg, i.p.) e a adrenalectomia (retirada bilateral das adrenais) reverteram a atividade hiponociceptiva da natação, respectivamente. Além disso, foi demonstrado que o sistema serotoninérgico também participa no efeito hiponociceptivo do nado, tendo em vista que o pré-tratamento dos animais, por 4 dias consecutivos, com ρ -clorofenilalanina metil éster (PCPA, 100 mg/kg, i.p., um inibidor da síntese de serotonina) reverteu a hiponocicepção. A natação não foi capaz de alterar a migração de células inflamatórias ocasionadas pela peritonite induzida pelo ácido acético e não alterou a atividade locomotora dos animais avaliada pelo teste do campo aberto. Estes dados fornecem evidência de que os sistemas: opioidérgico e serotoninérgico participam da atividade hiponociceptiva ocasionada pelo exercício físico em camundongos.

Palavras-chaves: Exercício físico, nocicepção, natação, sistema opióide, serotonina, camundongo.

ABSTRACT

Exercise is physical activity that is planned, structured, repetitive, and purposive in the sense that improvement or maintenance of one or more components of physical fitness is an objective. Actually it has been known that physical exercise practice exerts physical and mental health benefits; moreover, it helps in painful conditions control. It is unknown if there is a specific intensity of exercise that produced hyponociception and the mechanisms involved. To address these questions it was evaluated the influence of 5 days swimming (30 min/day, water at 37°C) above nociceptive threshold of *Swiss* male mice in the abdominal constriction induced by acetic acid test (0,6%, i.p.). Initially it was evaluated the nociceptive response of two control groups: (1) (non-exercised) submitted to 30 seconds/ day to swimming and (2) (non-exercised) submitted to stay 30 minutes in warmish shallow water/day. These groups had a similar nociceptive response. In the subsequent experiments it was used just control 1 group. The exercised animals had a inhibition of 44±3% in the number of abdominal constrictions when compared to control 1 group (non-exercised 30 seconds/day). Through the blood lactate level it was found that the dominion, in relationship to effort intensity, was severe in this swimming protocol. Following it was measured the time course of the swimming hyponociception, it was effective in the reduction of visceral nociception 12h e 24h after exercise, with inhibition of 43 ± 10 and 45 ± 4%, respectively. It was evidenced the participation of opioid system and adrenal glands in the swimming hyponociceptive activity, because: naloxone (1mg/kg, i.p.) and adrenalectomy (bilateral adrenal glands removal) reverted the swimming hyponociceptive activity, respectively. Besides, it was demonstrated that serotonergic system also participated in the hyponociceptive effect of swimming, the pre-treatment for four consecutive days with ρ -chlorophenylalanine methyl ester (PCPA, 100 mg/kg, i.p., an inhibitor of serotonin synthesis) reverted the hyponociception caused by physical exercise. The swimming exercise didn't change the inflammatory cells migration induced by acetic acid peritonitis and did not alter the locomotor activity of the animals evaluated by open field test. These data provide evidence that the opioidergic and serotonergic systems participate in the hyponociceptive activity caused by swimming in mice.

Key words: Physical exercise, nociception, swimming, opioid system, serotonin, mouse.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Contorção após irritação visceral em roedor.....	15
Figura 2	Inervação sensorial do trato gastrointestinal.....	18
Figura 3	Organização anatômica da inervação sensorial visceral espinal.....	19
Figura 4	Distribuição supra-espinal das aferências e modulação da transmissão nociceptiva visceral.....	24
Figura 5	Diagrama dos sistemas inibitórios descendentes noradrenérgicos e serotoninérgicos.....	26
Figura 6	Representação da caixa plástica utilizada pelos camundongos para prática da natação.....	38
Figura 7	Esquema demonstrando o protocolo de natação e o dia que o teste nociceptivo foi realizado.....	39
Figura 8	Contorção abdominal típica.....	41
Figura 9	Esquema ilustrativo dos grupos utilizados no teste de nocicepção induzida pelo ácido acético.....	41
Figura 10	Protocolo utilizado para a investigação do envolvimento dos receptores opióides e serotonina endógena.....	44
Figura 11	Protocolo utilizado para a investigação do envolvimento dos opióides endógenos liberados pelas glândulas adrenais.....	45
Figura 12	Decurso temporal da hiponocicepção induzida pela natação.....	50
Figura 13	Hiponocicepção induzida pela natação.....	51
Figura 14	Efeito da natação sobre a migração de células inflamatórias.....	52
Figura 15	Avaliação da atividade locomotora.....	53
Figura 16	Envolvimento do sistema opióide na atividade hiponociceptiva da natação.....	54
Figura 17	Envolvimento da adrenalectomia bilateral no efeito hiponociceptivo da natação.....	55
Figura 18	Envolvimento do sistema serotoninérgico na atividade hiponociceptiva da natação	57
Figura 19	Prováveis mecanismos envolvidos no efeito hiponociceptivo do exercício físico.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Protocolo de natação.....	39
Tabela 2	Determinação dos níveis de lactato sanguíneo.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACR** = aminoácidos de cadeia ramificada
- ACTH** = hormônio adrenocorticotrópico
- AGL** = ácidos graxos livres
- ASICs** = Canais iônicos sensíveis a ácidos
- ATP** = trifosfato de adenosina
- BVMR** = bulbo ventro medial rostral
- GABA** = ácido gama- aminobutírico
- GRD** = gânglio da raiz dorsal
- IL-6** = interleucina 6
- IL-8** = interleucina-8
- MFEL** = máxima fase estável do lactato
- NMDA** = N-metil-D-aspartato
- NTS** = núcleo do trato solitário
- PCPA** = ρ -clorofenilalanina metil éster
- POMC** = pró-opiomelanocortina
- SCP** = substância cinzenta periaquedutal
- SII** = síndrome do intestino irritável
- TNF- α** = fator de necrose tumoral alfa
- TRPV1** = receptor de potencial transitório vanilóide 1
- 5-HT** = 5-hidroxitriptamina ou serotonina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Dor e nocicepção.....	12
1.2	Dor e nocicepção visceral.....	14
1.3	Neurofisiologia da inervação visceral.....	16
1.3.1	Organização periférica e central da nocicepção sensorial visceral	16
1.3.2	Processamento central da nocicepção visceral.....	19
1.3.3	Excitabilidade dos neurônios aferentes viscerais.....	21
1.3.4	Hipersensibilidade dos neurônios centrais.....	23
1.3.4.1	Modelos de hiperalgesia intestinal.....	25
1.3.5	Controle descendente da dor.....	25
1.4	Exercício físico.....	29
1.4.1	Exercício físico e concentração de lactato sanguíneo.....	30
1.4.2	Nocicepção e exercício físico.....	31
1.4.2.1	Mecanismos envolvidos na hiponocicepção induzida pelo exercício físico.....	32
2	JUSTIFICATIVA.....	35
3	OBJETIVOS.....	36
3.1	Objetivo Geral.....	36
3.2	Objetivos Específicos.....	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1	Animais.....	37
4.2	Protocolo de natação.....	37
4.3	Determinação do domínio fisiológico em relação à intensidade de esforço..	39
4.4	Nocicepção visceral induzida pelo ácido acético.....	40
4.4.1	Avaliação do decurso temporal da hiponocicepção induzida pela natação.....	42

4.4.2	Controle para o possível estresse da submissão do camundongo a água aquecida.....	42
4.4.3	Avaliação da permeabilidade capilar peritoneal.....	42
4.5	Mensuração da atividade locomotora.....	43
4.6	Análise dos possíveis mecanismos de ação do efeito hiponociceptivo induzido pela natação.....	43
4.6.1	Envolvimento dos receptores opióides.....	45
4.6.2	Envolvimento dos opióides endógenos liberados pelas glândulas adrenais.....	46
4.6.3	Envolvimento do sistema serotoninérgico.....	46
4.7	Reagentes.....	47
4.8	Análise estatística.....	47
5	RESULTADOS.....	48
5.1	Domínio fisiológico em relação à intensidade de esforço (domínio severo).....	48
5.2	Natação induz hiponocicepção no modelo de nocicepção visceral causada pelo ácido.....	49
5.2.1	Natação induz hiponocicepção dependente do tempo após o exercício.....	49
5.2.2	Controle para o possível estresse da submissão dos camundongos a água aquecida.....	50
5.2.3	Natação não altera parâmetros de permeabilidade capilar peritoneal.....	51
5.3	Natação não modifica a atividade locomotora dos camundongos.....	52
5.4	Receptores opióides estão envolvidos na hiponocicepção induzida pela natação.....	53
5.4.1	Opióides endógenos liberados das glândulas adrenais também estão envolvidos na hiponocicepção induzida pela natação.....	55
5.5	Envolvimento da serotonina endógena na hiponocicepção induzida pela natação.....	56
6	DISCUSSÃO.....	58
6.1	Natação produz hiponocicepção no modelo de nocicepção visceral aguda..	58
6.2	Natação produz hiponocicepção através da ativação de receptores opióides.....	60

6.3	Opióides endógenos liberados das glândulas adrenais também estão envolvidos na hiponocicepção induzida pela natação.....	62
6.4	Envolvimento do sistema serotoninérgico.....	64
7	CONCLUSÃO.....	68
	REFERÊNCIAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor e nocicepção

A capacidade de detectar um estímulo nocivo é essencial para a sobrevivência de um organismo. Isto é ilustrado pela observação de indivíduos que sofrem de anormalidades congênitas, que os tornam incapazes de detectar estímulos nocivos. Estas pessoas, por exemplo, não percebem a dor causada por um objeto pontiagudo, calor da chama de um fogão ou mesmo o desconforto associado a lesões internas, tais como fraturas ósseas. Como resultado, elas não manifestam comportamentos apropriados de proteção contra estas condições, muitas das quais podem ameaçar a vida (BASBAUM et al., 2009; JULIUS, BASBAUM, 2001).

Mais comumente, alterações nas vias da dor levam a hipersensibilidade, como por exemplo: uma dor aguda que se perpetua não mais servindo como um sistema de alerta, mas ao contrário, torna-se crônica e debilitante. Isto pode ser visto, dependendo do nível, como a extensão de um processo normal de cura, onde o dano nervoso ou tecidual causa hiperatividade promovendo a proteção da área lesada. Isto se torna evidente após uma queimadura solar, ela produz uma sensibilização temporária da região afetada; como resultado, um estímulo normalmente inócuo como um toque leve ou água morna são percebidos como dolorosos: um fenômeno referido como alodinia; ou um estímulo que geralmente causa dor é capaz de gerá-la com uma intensidade muito maior: referido como hiperalgesia (JULIUS e BASBAUM, 2001), contudo, em seu extremo, a sensibilização não resolve. Assim, indivíduos que com patologias como: artrite, neuralgia pós-herpética ou câncer ósseo sofrem de dor intensa e persistente, causando debilitação física e psicológica (BASBAUM et al., 2009).

A síndrome de dor crônica pode persistir após uma lesão aguda e pode ser iniciada tanto periférica, quanto centralmente, sendo que sua manutenção deve-se a alterações plásticas em nível central. Em ambos os casos a elucidação das moléculas e tipos celulares

que dão suporte a sensação de dor aguda é a chave para o entendimento dos mecanismos que geram a hipersensibilidade (BASBAUM et al., 2009; HUNT, MANTYH, 2001).

Quando se trata do estudo da dor, no que se refere a suas vias e mecanismos, há várias limitações quanto ao uso de seres humanos para experimentação. Somente estímulos de fraca intensidade que não produzem danos irreversíveis podem ser impostos a voluntários, além disso, a experimentação em pacientes torna-se complicada pelas cirurgias prévias e doenças associadas. A maioria das observações é limitada a dor cutânea e, além disso, o efeito placebo é um importante fator de complicação aos estudos (HOGAN, 2002). Sendo assim, o emprego e o desenvolvimento de modelos animais que mimetizam as condições médicas dolorosas são importantes para a compreensão dos processos que desencadeiam a dor (HOGAN, 2002).

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor como “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada a uma lesão tecidual real ou possível ou descrita em termos de tal dano” (MERSKEY et al., 1979; LOESER, TREEDE, 2008). Sua percepção é complexa e não envolve apenas a transdução de um estímulo nocivo, mas também processos emocionais e cognitivos (BASBAUM et al., 2009; JULIUS, BASBAUM, 2001).

Como a dor envolve uma atividade subjetiva e capacidade verbal de descrição, não se pode afirmar que os animais sentem dor. Eles apresentam respostas fisiológicas ou comportamentais frente a estímulos que se infere serem semelhantes à dor humana. Assume-se que tais respostas são devido a uma sensação nociceptiva desencadeada pelos estímulos detectados e transmitidos pelo sistema nervoso do animal. O maior argumento de que esta hipótese está correta vem da observação de que fármacos com efeito analgésico no homem, quando administradas em animais, apresentam atividade antinociceptiva. Da mesma maneira, fármacos que são antinociceptivos nos animais, frequentemente são analgésicos no homem (MOGIL, 2009; HOGAN, 2002; TJØLSEN, HOLE, 1997).

Devido ao fato de que a dor é um problema de saúde altamente importante e tema de muitos estudos e, levando em consideração que as pesquisas sobre dor em humanos, como descrito nos parágrafos anteriores, são desafiadoras, fundamentalmente subjetivas e limitadas eticamente, os modelos de nocicepção realizados em animais de laboratório são amplamente empregados (MOGIL, 2009).

1.2 Dor e nociceção visceral

Estima-se que pacientes apresentando transtornos gastrointestinais funcionais geram gastos ao governo de aproximadamente 41 bilhões de dólares por ano, nos oito principais países industrializados (economias ocidentais), principalmente pela utilização de serviços de saúde e faltas no trabalho (FULLERTON, 1998).

A dor abdominal pode resultar de doença orgânica visceral ou cirurgia, mas também representa o principal sintoma dos transtornos gastrointestinais funcionais, tais como síndrome do intestino irritável (SII) (BUÉNO, FIORAMONTI, GARCIA-VILLAR, 2000).

Observações clínicas de pacientes com SII indicam que os reflexos motores estão aumentados e associados a uma diminuída pressão intraluminal que gera sensações de dor (hipersensibilidade visceral). Estas observações estão de acordo com dados eletrofisiológicos realizados em animais mostrando que, sob condições inflamatórias, os barorreceptores de alto e baixo limar da parede intestinal são ativados com pressões intraluminares baixas, normalmente não-efetivas (BUÉNO, FIORAMONTI, GARCIA-VILLAR, 2000). A presença de nociceptores silenciosos na parede intestinal (que podem ser ativados por sinais imunes) também é importante na gênese da dor abdominal crônica. (BUÉNO, FIORAMONTI, GARCIA-VILLAR, 2000).

Os mecanismos da dor visceral ainda são pobremente conhecidos quando comparados aos da dor somática. Isto se deve principalmente pela natureza diversa da dor visceral sendo esta composta por múltiplos fatores como: dimorfismo sexual, estresse psicológico, herança genética e a natureza da doença predisponente (McMAHON, KOLTZENBURG, 2006).

Devido aos fatores descritos anteriormente é um desafio enorme o desenvolvimento de modelos animais que mimetizem a exata condição da doença. Apesar disso, é bem reconhecido que a hipersensibilidade visceral pode ocorrer devido a: (1) sensibilização dos aferentes sensoriais primários que inervam a víscera, (2) hiperexcitabilidade dos neurônios de segunda ordem que recebem aferências viscerais (sensibilização central) e, (3) desregulação das vias descendentes que modulam a transmissão nociceptiva visceral (CANNING, SPINA, 2009).

Na nociceção visceral, avaliada em roedores, uma medida importante são os movimentos espontâneos. Após irritação do peritônio (por exemplo, após injeção de ácido acético) ou da mucosa das vísceras abdominais, o comportamento espontâneo inclui:

arqueamento do dorso, lambidas no abdômen, inclinação da pelve, estiramento, fricção do abdômen contra o solo e rolamento (Figura 1 A, B, C, D, E e F, respectivamente) (HOGAN, 2002).

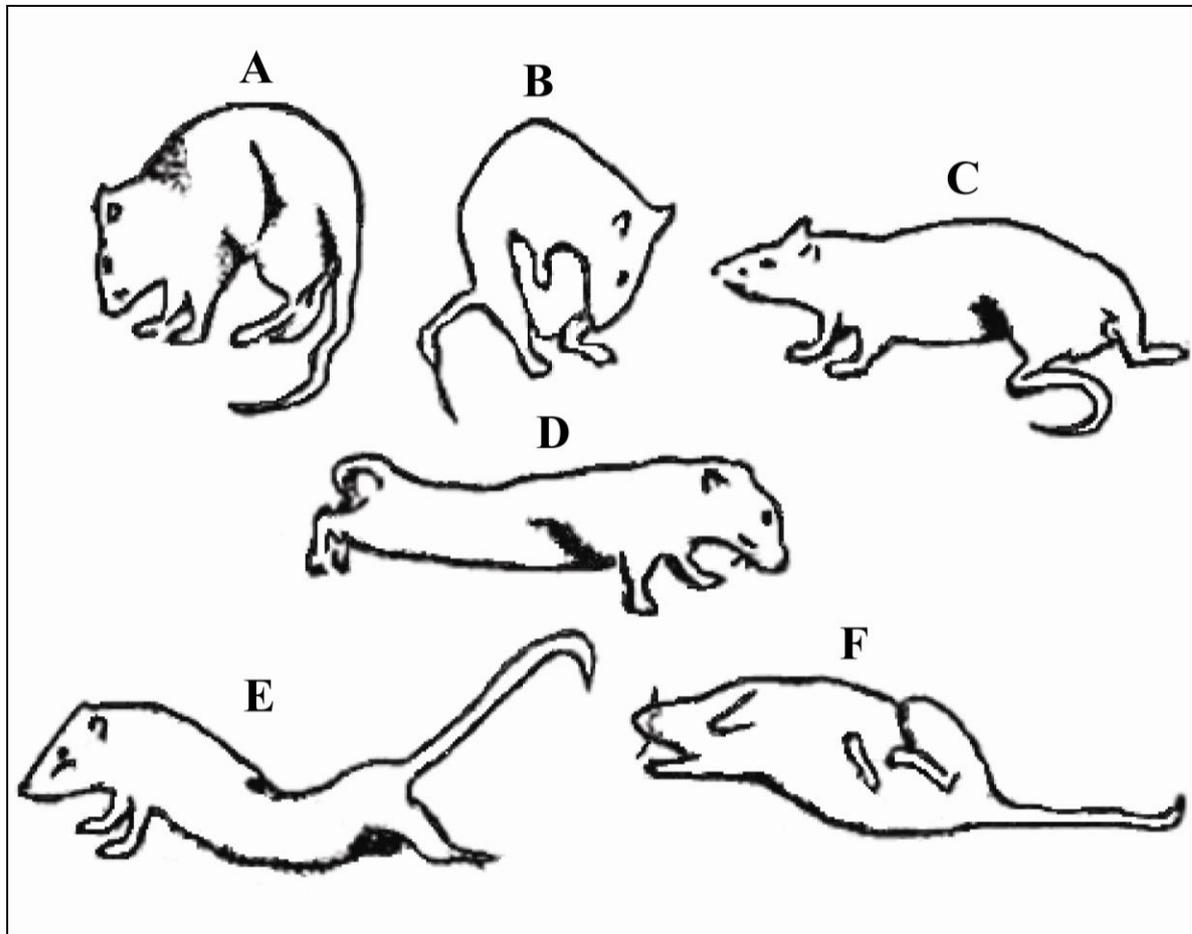


Figura 1. Contorção em um roedor após irritação visceral, neste caso do ureter. Comportamentos característicos podem incluir arqueamento do dorso (A), lambidas no abdômen (B), inclinação da pelve (C), estiramento (D), fricção do abdômen contra o solo (E) e rolamento (F). Fonte: Adaptado de Giamberardino et al., 1995.

Nos últimos dez anos foi dedicada atenção especial aos papéis desempenhados por mastócitos e citocinas na dor abdominal. Ambos induzem mudanças na sinalização ao sistema nervoso central e desempenham papel fundamental na alteração dos reflexos motores e sensibilidade dos barorreceptores associados aos sintomas gastrointestinais (BUÉNO, FIORAMONTI, GARCIA-VILLAR, 2000).

Todavia, é importante o conhecimento das estruturas e mediadores especificamente envolvidos, no nível do trato gastrointestinal, em situações experimentais que mimetizam os eventos que acontecem na hiperalgesia visceral (BUÉNO, FIORAMONTI, GARCIA-VILLAR, 2000). Dentre os modelos de hiperalgesia visceral podemos citar a administração intraperitoneal de agentes irritantes, como por exemplo, o ácido acético.

As principais características da dor visceral são:

- Difusa e pobremente localizada;
- Referida e não percebida na origem;
- Produzida por estímulos diferentes daqueles que ativam os nociceptores somáticos;
- Estímulos adequados para a produção de dor visceral incluem: distensão de órgãos ocos, tração do mesentério, isquemia e químicos tipicamente associados a processos inflamatórios;
- Está associada a fortes respostas emocionais e autonômicas (para revisão ver CERVERO, 1994; NESS, GEBHART, 1990).

1.3 Neurofisiologia da dor visceral

1.3.1 Organização periférica e central da inervação sensorial visceral

Com exceção de um pequeno número de fibras A β associadas a corpúsculos de Pacini, no mesentério, a grande maioria das fibras aferentes viscerais são fibras A δ (pouco mielinizadas) e fibras C (não-mielinizadas). Acredita-se que a maioria dos seus terminais periféricos sejam terminações nervosas livres não-encapsuladas (BLACKSHAW, GEBHART, 2002; LYNN et al., 2003; ZAGORODNYUK, CHEN, BROOKES, 2001; ZAGORODNYUK et al., 2003).

Os terminais (terminações nervosas livres) dos neurônios aferentes primários viscerais estão localizados na mucosa, músculo e serosa (mesentério), permitindo que eles respondam a distensão de órgãos ocos, tração do mesentério, isquemia e inflamação (BLACKSHAW, GEBHART, 2002; GEBHART, 2000).

Os terminais sensíveis a estímulos mecânicos (mecanoceptores) são os mais conhecidos, eles estão associados às camadas musculares e respondem a tensão e estiramento. Além disso, os mecanoreceptores podem ser sensibilizados por exposição prévia a estímulo químico e/ou térmico (NESS, GEBHART, 1990; BLACKSHAW, GEBHART, 2002). Além dos terminais sensíveis a estímulos mecânicos na víscera, existem os receptores sensíveis a

estímulos químicos e térmicos, mas pouco se sabe sobre a morfologia dos seus terminais periféricos.

Dentre todos os tecidos do corpo, as vísceras são os únicos que recebem inervação de dois grupos de nervos: vagal e espinal (GEBHART, 2000; McMAHON, KOLTZENBURG, 2006). Todas as fibras aferentes viscerais são contidas em nervos que terminam na medula espinal, exceto aquelas do nervo vago, que terminam no tronco encefálico, fornecendo um componente craniano (supra-espinal) da inervação sensorial visceral (McMAHON, KOLTZENBURG, 2006).

O nervo vago é o nervo sensorial de mais longo alcance no corpo. Pelo menos 80% dos axônios vagais são aferentes e a maioria dos órgãos internos é inervada por ele, por exemplo: estômago, intestinos grosso e delgado (BERTHOUD, NEUHUBER, 2000; CERVERO, 1994; NESS, GEBHART, 1990).

Os corpos celulares das fibras aferentes vagais estão contidos no gânglio nodoso (principalmente) e no gânglio jugular (Figura 2). Seus terminais centrais estão localizados principalmente no núcleo do trato solitário (NTS) no bulbo dorsal. No entanto, nem todos aferentes vagais terminam no NTS, sendo que cerca de 5% se projetam diretamente para e terminam na medula espinal cervical superior (C1-C2), acredita-se que estes contribuam para as sensações referidas, bem como, mecanismos proprioespinais da modulação nociceptiva (FOREMAN, 1998).

Evidências sugerem que a estimulação das fibras aferentes vagais, em humanos e animais, pode atenuar a dor somática e visceral. O efeito analgésico produzido pela ativação vagal poderia estar relacionado à sua influência descendente inibitória sobre os disparos dos neurônios do corno dorsal espinal ou através da liberação de catecolaminas da medula da glândula adrenal (MULTON, SCHOENEN, 2005; SEDAN, SPRECHER, YARNITSKY, 2005; KIRCHNER et al., 2000; NESS et al., 2000; JÄNIG et al., 2000; THURSTON, RANDICH, 1992; REN, RANDICH, GEBHART, 1991; REN et al., 1993).

A inervação das vísceras pelos nervos espinais está distribuída dos segmentos cervicais até os sacrais (Figura 2). Todos os nervos espinais possuem seus corpos celulares no gânglio da raiz dorsal e a maioria passa pelos gânglios pré e para-vertebrais em direção a medula espinal (Figura 2 e 3) (McMAHON, KOLTZENBURG, 2006).

No gânglio pré-vertebral os axônios dos nervos viscerais frequentemente emitem projeções que fazem sinapse com neurônios motores ou secretórios contidos no gânglio, e assim, podem influenciar a função (ex. motilidade) do trato gastrointestinal. Além disso, as fibras aferentes viscerais que chegam até a medula espinal através do gânglio paravertebral

podem se dirigir rostral ou caudalmente no tronco simpático, atingindo segmentos espinais distantes (McMAHON, KOLTZENBURG, 2006).

Sem levar em consideração a via até a medula espinal, as fibras aferentes viscerais espinais terminam:

- No corno dorsal superficial (lâminas I e II);
- Na coluna celular intermediolateral e no núcleo parassimpático sacral, onde elas influenciam a saída eferente simpática e parassimpática da víscera e
- Em torno do canal central, em uma área denominada lâmina X.

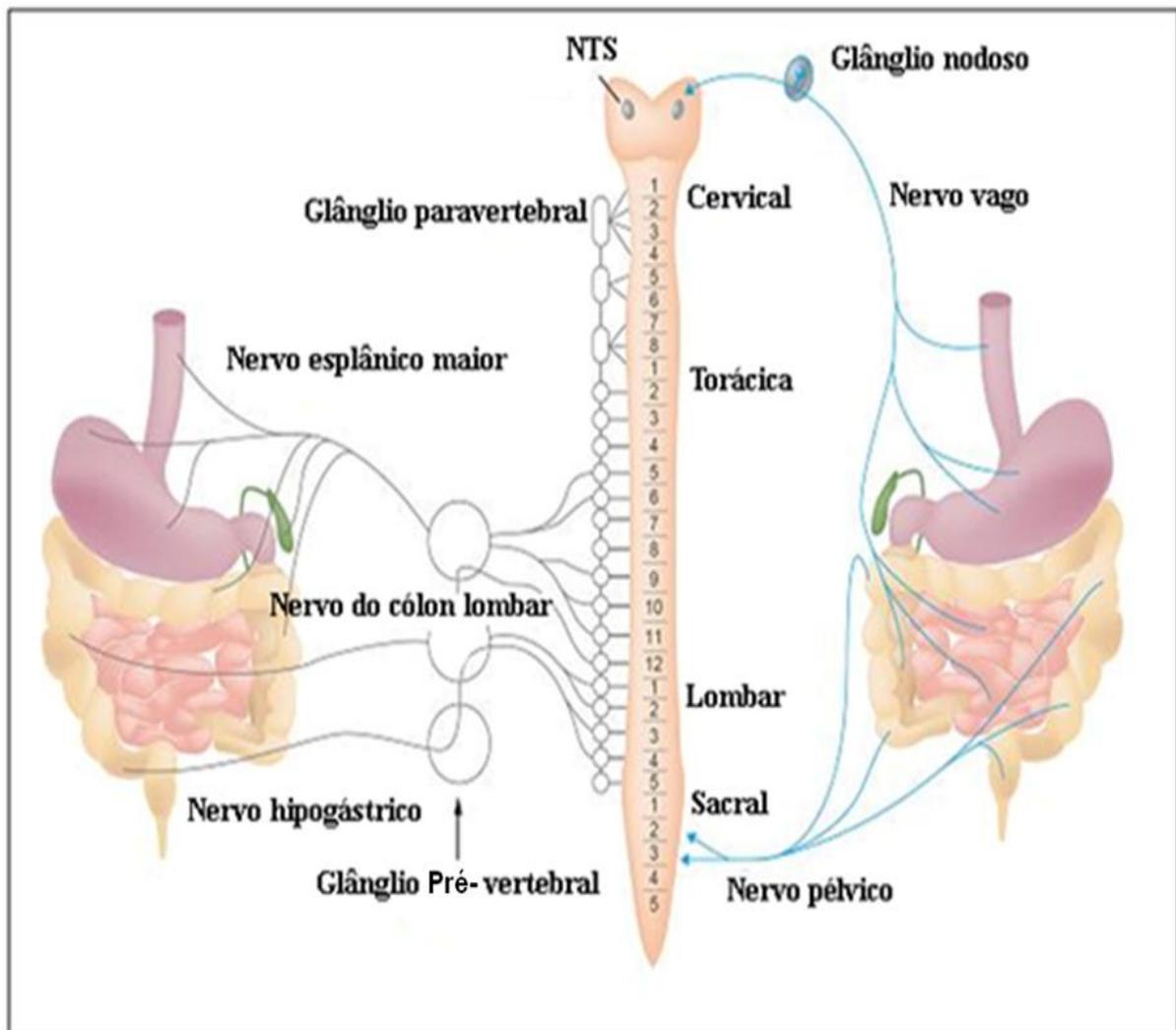


Figura 2. Representação da inervação sensorial do trato gastrointestinal. Esquerda: vias aferentes viscerais passando pelos gânglios pré- e para-vertebrais até a medula espinal. Direita: aferências dos nervos aferentes vagais e pélvicos através dos gânglios: nodoso e gânglio da raiz dorsal, respectivamente. A aferência gástrica ao sistema nervoso central está representada no tronco encefálico e medula espinal torácica pelas aferências vagais e esplâncnicas. Fonte: adaptado de Blackshaw, Gebhart, 2002.

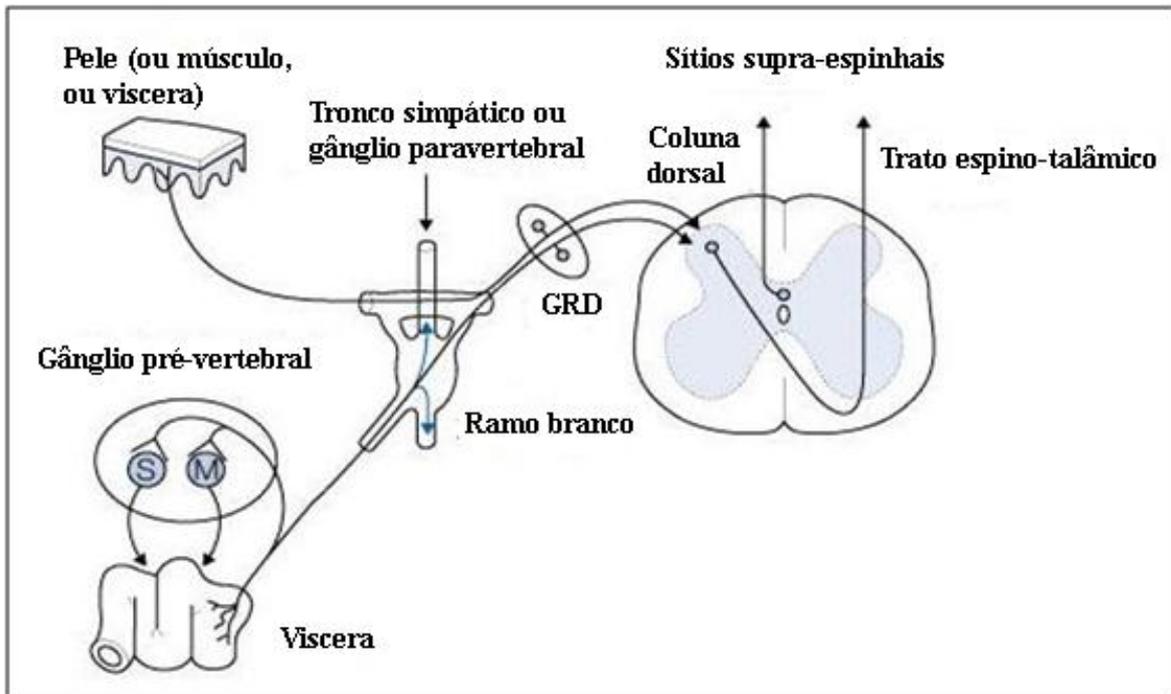


Figura 3. Organização anatômica da inervação sensorial visceral espinal. As fibras aferentes espinais viscerais possuem seus corpos celulares no gânglio da raiz dorsal (GRD) e terminam no corno dorsal da medula espinal, onde a informação sensorial visceral é transmitida rostralmente através do trato espinotalâmico contralateral ou coluna dorsal ipsilateral a centros supra-espinais. Muitos aferentes viscerais espinais formam colaterais e terminam em neurônios secretórios (S) ou motores (M) no gânglio pré-vertebral e podem influenciar as secreções e motilidade gastrointestinais. É importante observar que os aferentes espinais viscerais podem ascender ou descender dentro do tronco simpático e se dirigir a segmentos espinais distantes. Também é ilustrada a convergência de aferências viscerais e cutâneas em neurônios de segunda ordem na medula espinal. Fonte: adaptado de MacMahon, Koltzenburg, 2006.

Além da inervação sensorial extrínseca, a maioria das vísceras (ex. o trato gastrointestinal) também possui uma inervação independente realizada por nervos intrínsecos. No caso do trato gastrointestinal a inervação codifica padrões básicos, regulando a secreção, motilidade e fluxo sanguíneo e interage com a inervação extrínseca, sendo este mecanismo pobremente conhecido até o momento (McMAHON, KOLTZENBURG, 2006).

1.3.2 Processamento central da nocicepção visceral

Os neurônios de segunda ordem na medula espinal, que recebem aferências viscerais, estão localizados principalmente nas lâminas espinais superficiais (lâminas I e II), e mais profundamente na lâmina V e medial no canal central lombosacral (lâmina X) (McMAHON, KOLTZENBURG, 2006).

O trato espinotalâmico é uma das principais vias que conduzem a informação nociceptiva da pele (Figura 3), articulações e músculos para regiões supra-espinais.

Entretanto, a transeção bilateral do trato espinotalâmico não bloqueia as respostas comportamentais à estimulação visceral nociva em ratos. Consistente com esses achados, neurônios dentro do tálamo póstero-lateral ventral continuam respondendo a estimulação visceral após cordotomias bilaterais que bloqueiam os tratos espinotalâmicos (AL-CHAER et al., 1996; NESS, et al., 2000). Estudos adicionais mostram que os neurônios espinais viscerosceptivos pós-sinápticos da coluna dorsal se originam principalmente na lâmina X, ascendem ao tálamo contralateral através das vias grácil-talâmica e cuneiforme-talâmica (WILLIS et al., 1999, Figura 3). Para confirmar a importância desta via sobre a nocicepção visceral, a transeção das colunas dorsais, mas não do trato espinotalâmico, abole o comportamento nociceptivo em resposta a estimulação visceral nociva.

É possível que esses resultados sejam explicados devido a um maior número de neurônios sensoriais viscerais se projetarem através das colunas dorsais, quando comparados ao trato espinotalâmico. Entretanto, lesões bilaterais das colunas dorsais não afetam as respostas autonômicas à estimulação visceral nociva e reflexos mediados dentro do tronco encefálico, sugerindo que as informações que contribuem para as dimensões afetiva, autonômica e discriminatória da dor visceral são transportadas por diferentes vias (NESS, 2000).

Dentro do tálamo as aferências viscerais se projetam principalmente para o núcleo póstero-lateral ventral, onde a maioria dos neurônios recebe entrada somática convergente. Estudos de ativação encefálica usando tomografia por emissão de pósitrons ou ressonância magnética funcional identificaram locais corticais e subcorticais que participam do processamento da dor visceral em humanos. O estímulo nocivo visceral produz ativação bilateral de áreas talâmicas e corticais, um padrão que difere de maneira sutil daquele produzido por estimulação somática nociva (AZIZ et al., 2000; STRIGO et al., 2003). Um sistema organizado lateralmente inclui o tálamo póstero-lateral ventral e póstero-medial e o córtex somatossensorial, fornecendo as funções discriminativas associadas à percepção da dor.

Em comparação, o sistema organizado medialmente, compreendendo o núcleo talâmico medial, o giro cingulado anterior e a ínsula, são responsáveis pelas respostas emocionais e autonômicas geradas pela dor (McMAHON, KOLTZENBURG, 2006).

1.3.3 Excitabilidade dos neurônios aferentes viscerais

Modelos inflamatórios de hipersensibilidade visceral estão associados a um aumento na excitabilidade dos neurônios aferentes primários, evidenciado por uma diminuição do limiar para a geração de um potencial de ação e um maior número de potenciais de ação durante estimulação prolongada. Isto ocorre, pelo menos em parte por mudanças nas correntes de sódio, demonstrando o papel dos canais de sódio resistentes a tetrodotoxina na hipersensibilidade visceral (BIELEFELDT, OZAKI, GEBHART, 2002; STEWART et al., 2003). Semelhante aos canais de sódio, vários canais de cálcio sensíveis a voltagem foram identificados em neurônios sensoriais viscerais, que expressam correntes de cálcio de alto e baixo limiar (McMAHON, KOLTZENBURG, 2006).

Por outro lado, a ativação de canais de potássio sensíveis a voltagem é responsável pela fase de repolarização do potencial de ação. A alta concentração de potássio dentro da célula comparada ao compartimento extracelular favorece o efluxo deste íon, que é o maior responsável pelo potencial de repouso da membrana. Assim a ativação de longa duração dos canais de potássio hiperpolariza a célula e diminui a excitabilidade neuronal. Várias correntes de potássio distintas já foram descritas em neurônios sensoriais viscerais. Enquanto suas propriedades são similares aquelas observadas em outros neurônios sensoriais, estudos sugerem que neurônios sensoriais viscerais expressam correntes de potássio transitórias (corrente A) que diferem em relação à dependência de voltagem e cinética das correntes A típicas encontradas em neurônios sensoriais somáticos. Interessantemente, esta corrente de inativação lenta, bem como, uma corrente de potássio de inativação mais rápida diminuem significativamente após inflamação do trato gastrointestinal associada com hipersensibilidade visceral, demonstrando a importância da expressão e modulação dos canais de potássio na determinação da duração e padrões de disparo dos potenciais de ação (DANG, BIEFELDT, GEBHART, 2004).

Neurônios aferentes primários viscerais também expressam canais iônicos que são ativados por ligantes, temperatura ou prótons. Vários canais iônicos dependentes de ligantes estão implicados nos mecanismos de dor visceral. Dois em particular, parecem desempenhar um papel importante na nocicepção visceral: o receptor de serotonina (5-HT) 5-HT₃ e o receptor purinérgico P2X. Dentro do trato gastrointestinal, estímulo mecânico e químico causam liberação de serotonina das células na camada epitelial. A serotonina, por sua vez, ativa neurônios intrínsecos dentro dos plexos entérico, bem como, aferentes (primários) extrínsecos. Além das células enterocromafins, mastócitos ativados e plaquetas liberam

serotonina que contribui para o desenvolvimento dos sintomas (McMAHON, KOLTZENBURG, 2006).

Estudos recentes fornecem evidências de que a estimulação mecânica de células epiteliais libera trifosfato de adenosina (ATP), o ligante fisiológico dos receptores P2X. A ativação destes receptores ativados por ligantes causa uma corrente para dentro, despolarizando a célula, gerando potenciais de ação (CHIZH, ILLES, 2001).

Canais iônicos ativados por ácido ou temperatura também são implicados na nocicepção visceral. Canais iônicos sensíveis a ácidos (ASICs) são canais de sódio insensíveis a voltagem (KELLENBERGER, SCHILD, 2002). ASIC1-3 são tipicamente expressos em neurônios sensoriais e estão envolvidos na isquemia visceral e dor inflamatória (BENSON, SUTHERLAND, 2001; HOLZER, 2003; SUGIURA et al., 2005). Enquanto o papel exato dos ASICs sobre a nocicepção química e mecânica visceral não está completamente compreendido, vários estudos sugerem sua participação na sensibilização periférica de neurônios aferentes primários viscerais. Inflamação crônica do trato intestinal humano aumenta a expressão de ASICs (YIANGOU et al., 2001). Complementando estes achados, o pico de amplitude das correntes sensíveis a ácido aumenta e a sensibilidade ao pH muda para concentrações mais baixas em neurônios do gânglio da raiz dorsal obtidos de animais com ulceração gástrica (SUGIURA et al., 2005)

Além dos membros da família ASIC, o receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1) também pode ser ativado por prótons. Entretanto, mudanças significativas no pH com valores de 5 ou menores são requeridas para ativar este canal iônico, pelo menos em condições normais (CATERINA, JULIUS, 2001). O calor é o estímulo fisiológico mais relevante para o TRPV1 na pele, e o canal iônico é tipicamente ativado por temperaturas nocivas. Interessantemente, aproximadamente 80% dos neurônios sensoriais viscerais no gânglio nodoso expressam o TRPV1, que é significativamente mais alto do que nos neurônios espinais que se projetam para a pele ou músculo. Considerando a projeção destes terminais, é improvável que a temperatura seja o estímulo relevante para o TRPV1 nas vísceras, embora o TRPV1 em neurônios sensoriais viscerais é similarmente ativado por capsaicina, prótons e calor (SUGIURA, BIELEFELDT, GEBHART, 2004).

Estudos recentes sugerem que lipídeos endógenos, produtos da via da lipooxigenase, funcionam como ligantes que ativam os receptores TRPV1. Estes lipídeos podem ser produzidos durante a inflamação, quando concomitantemente diminui o pH tecidual facilitando a ativação do receptor TRPV1. No trato gastrointestinal que é rico em

serotonina a ativação do TRPV1 pode ser aumentada pela serotonina (SUGIURA, BIELEFELDT, GEBHART, 2004).

1.3.4 Hipersensibilidade dos neurônios centrais

O entendimento da fisiologia dos neurônios aferentes primários viscerais estimulou o estudo dos mecanismos que contribuem para o desenvolvimento e manutenção de sensações anormais das vísceras. Estas sensações anormais, que caracterizam os transtornos intestinais funcionais como: cistite intersticial e cólica são exemplos de hiperalgesia visceral (GEBHART, 2000). A condução aumentada dos estímulos, provenientes dos nociceptores viscerais sensibilizados, ao sistema nervoso central aumenta a excitabilidade dos neurônios centrais, tanto ao nível da medula espinal quanto ao nível supra-espinal.

Gebhart e colegas (2004) demonstraram que aplicação intratecal de antagonistas de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e não-NMDA significativamente atenua a hipersensibilidade visceral em estudos comportamentais, sugerindo o envolvimento de neurônios nociceptivos centrais na hipersensibilidade visceral. Além disso, a nível supra-espinal o bulbo ventro medial rostral (BVMR) é a principal região envolvida na hipersensibilidade visceral, pelo seu papel central na modulação do controle descendente da transmissão aferente nociceptiva espinal (Figura 4).

Neste sentido, outras regiões como: córtex, amígdala, hipotálamo, dentre outras, influenciam na interpretação de eventos periféricos, modulando a atividade dos neurônios aferentes primários (McMAHON, KOLTZENBURG, 2006).

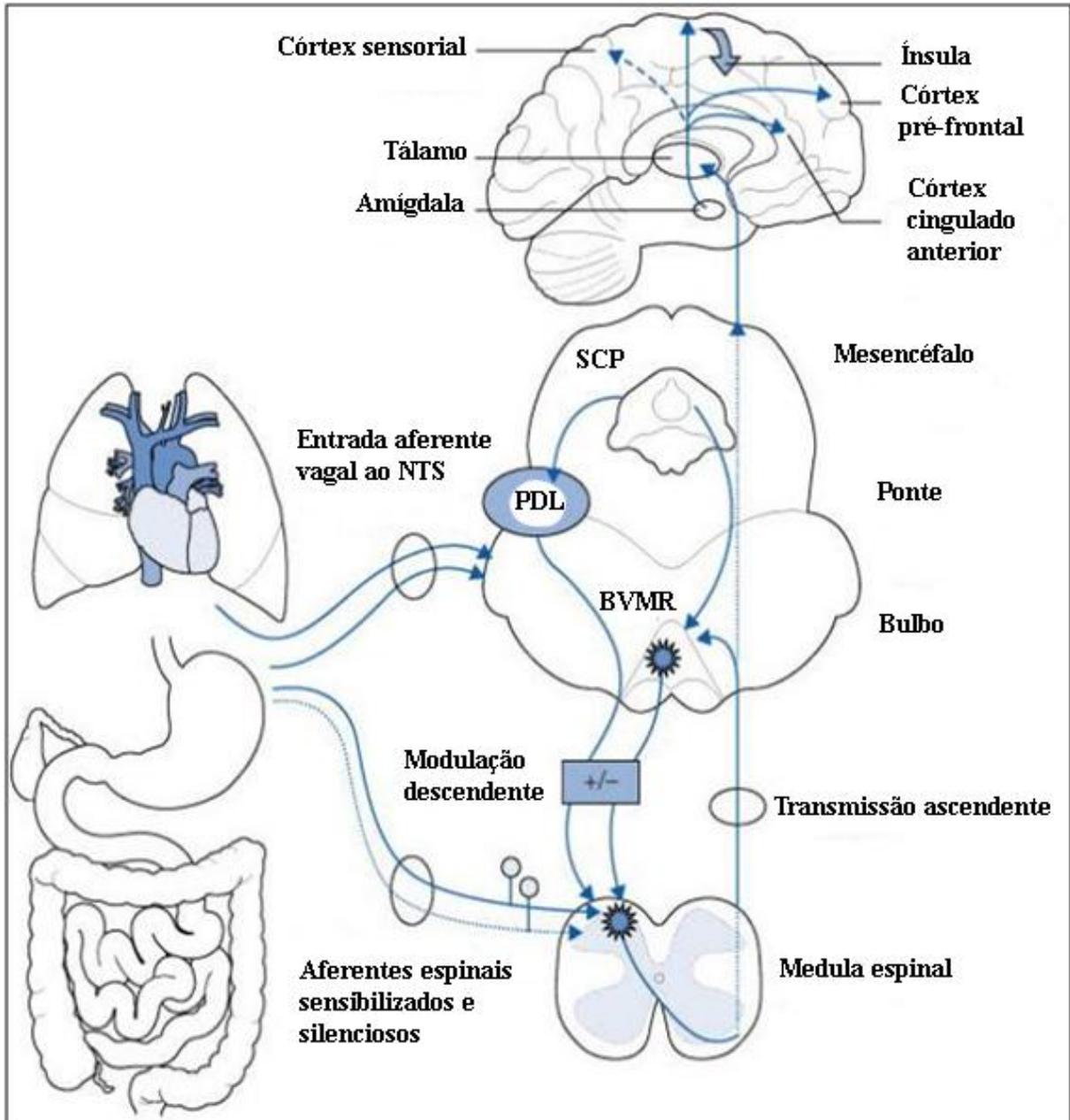


Figura 4. Distribuição supra-espinal das aferências e modulação da transmissão nociceptiva visceral. As aferências viscerais são transmitidas ao tálamo e divergem para vários alvos. Projeções discriminatórias das aferências nociceptivas viscerais ao córtex somatosensorial são relativamente menores (ilustradas pela linha descontínua) quando comparadas as aferências somáticas. As aferências nociceptivas viscerais são amplamente distribuídas, incluindo o córtex pré-frontal, córtex cingulado anterior e amígdala, e lateralmente à ínsula (como ilustrado projetando para fora do plano da figura). Influências descendentes da substância cinzenta periaquedual (SCP) através da ponte dorsolateral (PDL) e bulbo ventro medial rostral (BVMR) modulam a transmissão nociceptiva visceral espinal. Esta modulação pode ser tanto facilitatória (+) quanto inibitória (-). Neurônios no corno dorsal espinal e no BVMR são ilustrados como sensibilizados, representando a sensibilização central. Note que a aferência visceral para locais supra-espinais é conduzida em ambas: colunas dorsais e medula espinal ventrolateral, mas para ficar mais claro, somente as projeções na medula espinal ventrolateral são ilustradas. Fonte: adaptado de McMahon, Koltzenburg, 2006.

1.3.4.1 Modelos de hiperalgesia intestinal

Na última década, numerosos modelos animais de nociceção foram desenvolvidos com o objetivo investigar novos alvos para o tratamento da dor visceral. A maioria deles está baseada na indução de respostas viscerais e somáticas a estímulos mecânicos locais. No entanto, vários modelos de dor induzidos quimicamente foram desenvolvidos para avaliar dor espontânea ou mudanças comportamentais como indicadores de dor ou desconforto visceral. Por exemplo, a administração intra-lúmen ou intraparietal de agentes irritantes como ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS), formalina ou ácido acético (para revisão ver BUENO et al., 1997) frequentemente induzem hipersensibilidade a distensão visceral (BUÉNO, FIORAMONTI, GARCIA-VILLAR, 2000).

O teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético é descrito como um modelo típico de nociceção inflamatória visceral e permite avaliar a atividade hiponociceptiva de substâncias ou terapias que atuam tanto em nível central quanto periférico (KOSTER, ANDERSON, de BEER, 1959; VINEGAR et al., 1979; TJØLSEN e HOLE, 1997). Este modelo induz a liberação de diversos mediadores inflamatórios como bradicinina, prostaglandinas e citocinas inflamatórias (RIBEIRO et al., 2000; IKEDA et al., 2001).

É bem estabelecido que a injeção intraperitoneal de ácido acético induz nociceção visceral e inibe o esvaziamento gástrico em ratos. Além disso, antagonista do receptor de neurocinina do tipo 2 (SR-48968), um antagonista não-seletivo dos receptores B1 e B2 (NPC-567) da bradicinina e a administração intravenosa de um antagonista do receptor CGRP1 humano [(h)-CGRP-(8-37)] diminuem a nociceção visceral (número de contorções abdominais) ocasionada pelo ácido acético (BUÉNO, FIORAMONTI, GARCIA-VILLAR, 2000).

1.3.5 Controle descendente da dor

A nociceção é um processo bi-direcional de vias neuronais ascendentes e descendentes. Da periferia os sinais dolorosos são enviados ao corno dorsal da medula espinal e posteriormente a centros encefálicos superiores; do encéfalo há informações que atingem o corno dorsal da medula espinal através de diferentes conexões (BRILEY, MORET, 2003).

Sabe-se que a sensação dolorosa pode ser modificada pelos sistemas endógenos inibidores da dor, predominantemente através de vias descendentes noradrenérgicas,

serotoninérgicas (Figura 5) e opioidérgicas (YOSHIMURA, FURUE, 2006). A ativação dos sistemas de controle descendente da dor modifica marcadamente não somente a liberação de glutamato dos aferentes primários ou interneurônios, mas também a liberação de ácido gama-aminobutírico (GABA) e glicina (YOSHIMURA, FURUE, 2006). Além disso, a saída da informação nociceptiva para centros superiores através dos neurônios de projeção também é alterada. Como consequência, a percepção da dor é drasticamente reduzida (YOSHIMURA, FURUE, 2006).

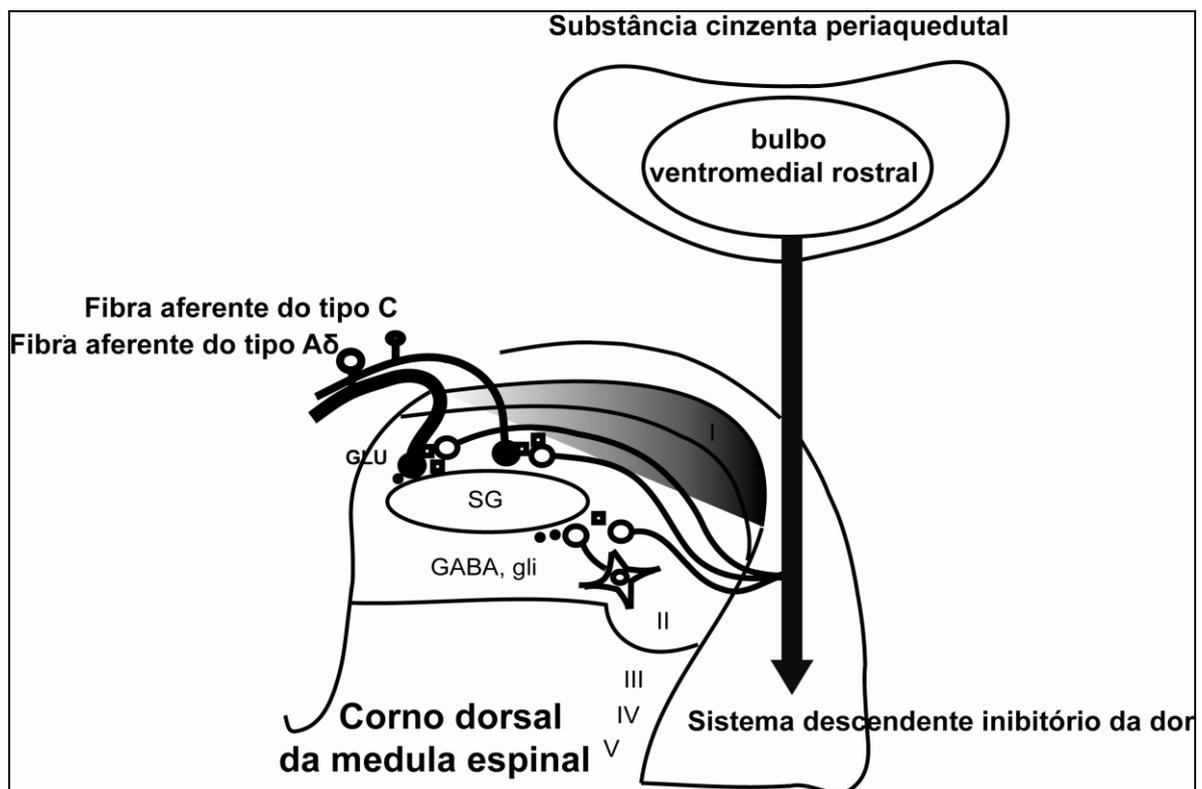


Figura 5. Diagrama dos sistemas inibitórios descendentes noradrenérgicos e serotoninérgicos, com terminações em membranas pós-sinápticas e terminais pré-sinápticos. Note que os interneurônios inibitórios também recebem abundantes aferências dos sistemas inibitórios descendentes. Fonte: adaptado de Yoshimura, Furue, 2006.

Experimentos realizados em fatias de núcleos do tronco encefálico, contendo neurônios noradrenérgicos e serotoninérgicos demonstram que estas regiões encontram-se tonicamente ativas (ISHIMATSU, WILLIAMS, 1996; PAN, WESSENDORF, WILLIAMS, 1993), desta forma, a liberação de glutamato, GABA e glicina, bem como, a excitabilidade de neurônios do corno dorsal da medula espinal podem ser controlada dinamicamente. Os sistemas descendentes inibitórios da dor podem ser acelerados temporariamente sob certas circunstâncias. Um exemplo clássico é que a maioria dos soldados no campo de batalha não sente dor, mesmo após sofrer severos ferimentos. Entretanto, após remoção a um local seguro e sob cuidados médicos passam a percebê-la. Esta ausência temporária de dor e medo pode

ajudá-los a permanecer conscientes possibilitando-os realizar julgamentos apropriados de como atuar em situações extremas. Muitos estudos comportamentais e *in vivo* identificaram as regiões que produzem tais efeitos analgésicos (WILLIS, COGGESHALL, 2004); destacando-se: o córtex (cingulado anterior, frontal e parietal); hipotálamo; substância cinzenta periaquedutal (SCP); núcleo parabraquial; núcleo do trato solitário; bulbo ventromedial rostral (BVMR, incluindo os núcleos da rafe); e núcleos noradrenérgicos A5, A6 (locus coeruleus), A7 (subcoeruleus) (YOSHIMURA, FURUE, 2006).

Os neurônios da SCP fazem conexões excitatórias com neurônios do bulbo rostroventral, principalmente com neurônios serotoninérgicos do núcleo magno da rafe. Neurônios desse núcleo projetam-se para a medula espinal através da parte dorsal do funículo lateral e fazem conexões inibitórias com neurônios das lâminas I, II e V do corno dorsal, que respondem à estimulação nociceptiva (KANDEL, SCHWARTZ, JESSEL, 2003; YOSHIMURA, FURUE, 2006).

Outros sistemas inibitórios descendentes que inibem a atividade dos neurônios nociceptivos do corno dorsal originam-se em neurônios noradrenérgicos do *locus coeruleus* e em outros núcleos do bulbo e ponte. Estas projeções descendentes bloqueiam os neurônios aferentes das lâminas I e V através de ações inibitórias diretas e indiretas. Eles também interagem com circuitos que contêm opióides endógenos no corno dorsal (KANDEL, SCHWARTZ, JESSEL, 2003; YOSHIMURA, FURUE, 2006).

Desde a descoberta do ópio da papoula sabe-se que os opióides, como a morfina e a codeína, são agentes analgésicos eficientes. A região da SCP é uma das regiões mais sensíveis para a indução dessa analgesia. O antagonista opióide naloxona bloqueia a analgesia induzida por estimulação elétrica, assim como analgesia induzida pela morfina. Esta descoberta sugere que o encéfalo possui receptores específicos para opióides (KANDEL, SCHWARTZ, JESSEL, 2003; BODNAR, 2008). Foram identificadas 3 principais classes de receptores opióides: μ , δ e κ . Além destes três receptores opióides clássicos, um novo receptor órfão semelhante aos receptores opióides foi estudado (KANDEL, SCHWARTZ, JESSEL, 2003; BODNAR, 2008).

A descoberta de receptores endógenos para opióides no encéfalo suscitou a questão da possível existência de ligantes endógenos correspondentes para esses receptores. As três classes principais de peptídeos opióides endógenos que interagem com receptores opióides foram identificadas: encefalinas, β -endorfinas e dinorfinas. Esses três peptídeos opióides são produzidos a partir de grandes precursores poliprotéicos codificados por três

genes diferentes: o gene da pró-encefalina, o gene da pró-opiomelanocortina e os genes da pró-dinorfina (KANDEL, SCHWARTZ, JESSEL, 2003; BODNAR, 2008).

As duas encefalinas, leucina e metionina-encefalina são pentapeptídeos pequenos. A β -endorfina é um produto da pró-opiomelanocortina (POMC), um polipeptídeo precursor que é principalmente expresso na hipófise e que dá origem ao hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). Tanto a β -endorfina quanto o ACTH são liberados na corrente sanguínea em resposta ao estresse. As dinorfinas são derivadas do produto da poliproteína do gene da dinorfina (KANDEL, SCHWARTZ, JESSEL, 2003; BODNAR, 2008).

Os peptídeos codificados pelos três genes de opióides apresentam distribuição distinta no sistema nervoso central, mas membros de cada família estão localizados em locais associados com o processamento ou modulação da nocicepção. Corpos celulares e terminações axonais contendo encefalina e dinorfina são encontrados na SCP, BVMR e no corno dorsal da medula espinal, principalmente nas lâminas I e II. A β -endorfina está restrita principalmente a neurônios do hipotálamo que mandam projeções para a região da substância cinzenta periaquedutal e para núcleos noradrenérgicos do tronco encefálico (KANDEL, SCHWARTZ, JESSEL, 2003; BODNAR, 2008).

Os opióides regulam a transmissão nociceptiva através de duas ações inibitórias: a inibição pós-sináptica, produzida parcialmente pelo aumento da condutância do K^+ e a inibição pré-sináptica da liberação de glutamato, substância P e outros neurotransmissores dos terminais dos neurônios sensoriais. A diminuição da liberação de neurotransmissores das fibras aferentes primárias, causada pelo opióide, é resultado indireto da diminuição da entrada de Ca^{2+} nos terminais sensoriais (como resultado do aumento da condutância de K^+) ou direto da diminuição na condutância de Ca^{2+} (TRESCOT et al., 2008; KANDEL, SCHWARTZ, JESSEL, 2003; BODNAR, 2008).

Os receptores opióides não estão restritos ao terminal central das fibras aferentes primárias, mas também estão localizados nos terminais periféricos da pele, articulações e músculos. A origem dos opióides endógenos que geralmente ativam os receptores opióides nas terminações sensoriais periféricas não está clara. Duas possíveis origens são as células cromafins da medula da glândula adrenal e células do sistema imune que migram para os sítios de lesão como parte do processo inflamatório, onde sintetizam opióides endógenos (BODNAR, 2008; KANDEL, SCHWARTZ, JESSEL, 2003).

Na literatura há evidências da possível interação entre os sistemas serotoninérgicos e opioidérgicos. No sistema nervoso central, os neurônios serotoninérgicos estão envolvidos na inibição da dor induzidas por agonistas opióides. Além disso, uma

umentada taxa de liberação de serotonina foi encontrada no corno dorsal da medula espinal de ratos quando morfina foi injetada na substância cinzenta periaquedutal (HAMON et al., 1991, HAUBRICH et al., 1984; FÜRST, 1999).

1.4 Exercício físico

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

Atualmente sabe-se que a prática de exercícios físicos exerce benefícios tanto para a saúde física, como mental. Ela reduz a incidência de patologias, como: câncer, diabetes, doenças cardíacas, osteoporose (COTMAN, BERCHTOLD, CHRISTIE, 2007; STEINMETZ, POTTER, 1996; BOOTH, 2002; FENTEM, 1994), promove neuroproteção, neuroplasticidade (HAYES et al., 2008; VIVEROS et al., 1979), melhora da cognição e possui atividade ansiolítica e antidepressiva (GREENWOOD, FLESHNER, 2008; COTMAN, BERCHTOLD, CHRISTIE, 2007). Além destes efeitos o exercício físico é capaz de influenciar o limiar nociceptivo (KUPHAL, FIBUCH, TAYLOR, 2007; KOLTYN, 2000). De maneira inversa, um estilo de vida sedentário é um fator de risco modificável para doenças cardiovasculares e doenças crônicas, como: diabetes *Mellitus*, câncer (cólon e reto), hipertensão arterial e depressão (SALMON, 2001; DISHMAN et al., 2006).

A natação é uma das formas de exercício físico mais praticadas em todo o mundo. Nos Estados Unidos e na maioria dos países industrializados a natação é a segunda modalidade de exercício dinâmico mais popular, ficando atrás somente de caminhadas (BOOTH et al., 1997; US CENSUS BUREAU, 2009). Com o intuito de estudar e compreender seus efeitos, o exercício físico do nado é realizado em roedores (KUPHAL, FIBUCH, TAYLOR, 2007; NOSAKA et al., 2003; STEVENSON et al., 1966).

A natação é uma forma atrativa de exercício físico, por ser facilmente acessível e barata. Além disso, a descarga de peso corporal é significativamente diminuída; as forças compressivas sobre a articulação são menores quando comparadas as de exercícios físicos praticados no solo e, como consequência, o impacto sobre o sistema músculo-esquelético e lesões são raros (BECKER, COLE, 1988; LEVY, KOLIN, BERSON, 1986), sendo assim,

torna-se uma forma ideal de exercício físico para pacientes obesos, idosos e com artrite. Entretanto, surpreendentemente pouco se sabe sobre os efeitos induzidos pela natação regular sobre a promoção da saúde e prevenção de doenças (TANAKA, 2009).

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

Em geral três métodos podem ser usados para orientar a intensidade do exercício físico: frequência cardíaca, nível de lactato sanguíneo e ritmo/velocidade do treinamento (FOSS, KETTYIAN, 2000). Nos exercícios de alta intensidade, os estoques de glicogênio muscular são quebrados com rapidez, com uma taxa respectivamente alta na formação de lactato - parte dele se difunde para fora das fibras musculares, onde ele é produzido, e aparece na corrente sanguínea (MAUGHAN, GLEESON, GREENHAFF, 2000). O acúmulo de lactato no sangue é, portanto, em grande parte, um reflexo da ativação das fibras musculares nas quais a capacidade glicolítica excede a capacidade do metabolismo oxidativo do piruvato (MAUGHAN, GLEESON, GREENHAFF, 2000).

1.4.1 Exercício físico e concentração de lactato sanguíneo

Do ponto de vista metabólico, a capacidade de resistência pode ser considerada como o maior estado estável de oferta de energia a partir da fosforização oxidativa (MADER, HECK, 1986), portanto, outra abordagem para avaliar o desempenho de resistência aeróbia é a determinação da maior intensidade constante de exercício, que pode ser mantida por um período mais longo de tempo sem um aumento contínuo do lactato sanguíneo (FAUDE, KINDERMANN, MEYER, 2009).

A máxima fase estável do lactato (MFEL) é provavelmente a maior concentração de lactato sanguíneo em que o equilíbrio pode ser alcançado entre o aparecimento e desaparecimento de lactato durante o exercício prolongado de carga constante. Nas cargas de exercício até a MFEL, há um equilíbrio entre a produção de lactato e sua remoção (FAUDE, KINDERMANN, MEYER, 2009). No entanto, com uma carga de trabalho superior a MFEL,

a taxa de produção de lactato excede a taxa de sua remoção. Por essa razão, a determinação direta de MFEL é considerada o padrão-ouro para avaliar a transição do metabolismo aeróbio/anaeróbio. Um aumento no sangue igual ou inferior a 1 mmol/L entre o 10º e o 30º minuto durante os ensaios de carga constante parece ser o procedimento mais razoável para a determinação da MFEL (URHAUSEN et al., 1993; BENEKE, 2003).

Gaesser e Poole (1996) propõem três domínios em relação à intensidade de esforço: moderado, pesado e severo. O domínio moderado compreende todas as intensidades de esforço que podem ser realizadas sem a modificação do lactato sanguíneo em relação aos valores de repouso. O domínio pesado começa a partir da menor intensidade de esforço onde o lactato se eleva, e tem como limite superior a intensidade correspondente à máxima fase estável de lactato. Para o domínio severo, não existe fase estável de lactato sanguíneo, com este se elevando durante todo o tempo de esforço, até que o indivíduo entre em exaustão.

1.4.2 Nociceção e exercício físico

Evidências demonstram que o exercício físico é um componente que auxilia no controle de algumas condições dolorosas (WRIGHT, SLUKA, 2001). Neste sentido, protocolos de exercício são usados na reabilitação de pacientes com doenças músculo-esqueléticas crônicas tais como: fibromialgia, lombalgia crônica e dor miofascial (GOWANS, de HUECK, 2004; WRIGHT, SLUKA, 2001). Além disso, vários investigadores relataram que uma sessão de exercício é capaz de alterar a percepção dolorosa, tanto durante quanto após a realização da mesma (KOLTYN, 2000; O'CONNOR, COOK, 1999).

Várias intensidades de exercício foram usadas em diferentes estudos (embora, em sua grande maioria, a intensidade não tenha sido comprovada através de análises bioquímicas) e ainda é desconhecido se há uma intensidade específica de exercício que seja necessária para produzir hipoalgesia. Entretanto, há relatos de que hipoalgesia é alcançada apenas com exercício físico de alta intensidade (KOLTYN, 2000). Neste contexto, poucos estudos investigaram os efeitos do exercício físico (particularmente de longa duração e por período prolongado) sobre a nociceção (KUPHAL, FIBUCH, TAYLOR, 2007).

Tem sido demonstrado que a percepção a um estímulo doloroso está diminuída após a prática de exercício físico (KOLTYN, 2002; KUPHAL, FIBUCH, TAYLOR, 2007). Este fenômeno é tipicamente conhecido como analgesia induzida pelo exercício, mas a terminologia mais adequada para este fenômeno é hipoalgesia induzida pelo exercício

(KOTYN, 2002). A Associação Internacional para o Estudo da Dor indica que a analgesia se refere à ausência de dor frente a um estímulo nocivo, enquanto que hipoalgesia significa sensibilidade diminuída a um estímulo nocivo (MERSKEY et al., 1979).

Na maioria dos estudos realizados nesta área os investigadores relataram sensibilidade diminuída frente a um estímulo nocivo ao invés de completa ausência de dor. Todavia o termo ‘hipoalgesia’ é utilizado para descrever a diminuição do limiar nociceptivo em modelos experimentais, principalmente realizados em humanos; enquanto que o termo ‘hiponocicepção’ é mais bem empregado quando se trata da diminuição do limiar nociceptivo em modelos animais (MARTINS et al., 2008).

1.4.2.1 Mecanismos envolvidos na hiponocicepção induzida pelo exercício físico

Apesar da existência de dados experimentais envolvendo exercício e nocicepção, os mecanismos precisos pelos quais o exercício causa hiponocicepção permanecem desconhecidos (KOLTYN, UMEDA, 2006). No entanto, o envolvimento do sistema opióide tem sido amplamente sugerido (HAIER, QUAID, MILLS, 1981; HOFFMAN, THORÉN, 1988; KOLTYN, 2000; BEMENT, SLUKA, 2005). As Beta-endorfinas são encontradas abundantemente nos olhos, coração, rins, trato gastrointestinal, medula espinal e encéfalo (IMURA, NAKAI, 1981). Além disso, as células cromafins da medula adrenal foram bem caracterizadas como uma rica fonte de opióides endógenos podendo ser úteis no controle da dor (STEIN, 1999). O exercício aeróbio vigoroso demonstrou ser hipoalgésico em homens e antagonistas opióides são capazes de reverter a analgesia induzida pelo mesmo (FULLER, ROBINSON, 1993; HAIER, QUAID, MILLS, 1981; JANAL et al., 1984; KOLTYN et al., 1996).

A neuroquímica específica da hiponocicepção não-opióide não está bem esclarecida, mas neurotransmissores como serotonina e norepinefrina são sugeridos como mediadores deste efeito (HOFFMANN et al., 1990). A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) compõe o grupo das aminas biogênicas (neurotransmissores), que incluem também as catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e dopamina). Estes compostos possuem grupos funcionais amina e regulam importantes vias do metabolismo dos mamíferos. A serotonina é obtida a partir do aminoácido essencial triptofano (MEEUSEN, de MEIRLEIR, 1995).

O triptofano, não podendo ser produzido pelo organismo, é obtido da degradação das proteínas cerebrais ou da circulação plasmática (*pool* aminoacídico), sendo este fornecido

através da ingestão dietética normal ou degradação protéica corporal (WURTMAN, FERBSTOM, 1975). No plasma, o triptofano pode circular livre (10%), ou, principalmente, ligado a uma proteína de transporte: a albumina (90%). Na barreira hematoencefálica, o triptofano livre compete com outros cinco aminoácidos (aminoácidos neutros: AN) para seu transporte e conseqüente síntese de serotonina encefálica (PARDRIDGE, CHOI, 1986). Os cinco aminoácidos competidores pela passagem através da barreira hematoencefálica são: leucina, isoleucina e valina (aminoácidos de cadeia ramificada: ACR), além da tirosina e fenilalanina (aminoácidos aromáticos) (ROSSI, TIRAPEGUI, 1999).

Os mecanismos que aumentam a concentração de triptofano, sobre a soma de seus competidores, provavelmente aumentam a síntese de serotonina encefálica (FERNSTROM, 1994). Outro aspecto da competição pela barreira hematoencefálica é o aumento da concentração da parcela livre do triptofano. A albumina também transporta ácidos graxos livres, quanto maior sua concentração plasmática mais triptofano livre é deslocado, melhorando sua captação encefálica (DAVIS, 1995). É aceito que a taxa de síntese de serotonina é dependente da disponibilidade do substrato (triptofano livre) no plasma, uma vez que a enzima limitante do processo no sistema nervoso central (triptofano hidroxilase) está cerca de 50% saturada (CHAOULOFF, 1993; WURTMAN, FERBSTOM, 1975).

Diante do exposto acima, constata-se que a síntese de serotonina encefálica pode ser modulada por três fatores: quantidade de triptofano total no plasma (proporção entre a parcela livre e a ligada à albumina); transporte de triptofano livre pela barreira hematoencefálica contra seus competidores e a atividade da enzima triptofano hidroxilase (ROSSI, TIRAPEGUI, 2004).

Durante o exercício físico de longa duração, dois eventos contribuem para o maior influxo de triptofano pela barreira hematoencefálica. Primeiro, os ACR são captados pelo músculo esquelético, sendo oxidados para fins energéticos; concomitantemente à queda da glicemia, efeito comum durante tais eventos. Com a redução da competição na barreira hematoencefálica, aumentaria a captação de triptofano e seu influxo encefálico (DAVIS, 1995). Em segundo lugar, com o prosseguimento do exercício, o organismo também começa a mobilizar, para fins energéticos, ácidos graxos (AGL) do tecido adiposo. Os AGL competem pelo transporte com o triptofano, sendo que esta competição pelos locais de ligação da albumina faz com que ocorra maior disponibilidade de triptofano livre (CURZON, KNOTT 1974). O sinergismo entre deslocamento da parcela livre, mediada por AGL, e menor competição, mediada pela redução plasmática dos ACR, tem como conseqüência maior produção de serotonina encefálica.

Hoffmann et al., (1990) investigaram se a estimulação do músculo esquelético do rato seria capaz de alterar o limiar doloroso, pois já se cogitava que o efeito hiponociceptivo do exercício seria mediado pela ativação dos aferentes musculares dos grupos III e IV. Sessenta minutos de estimulação de baixa frequência na pata posterior aumentou o limiar doloroso em ratos machos. Mas quando os animais foram pré-tratados com ρ -clorofenilalanina metil éster (PCPA), um bloqueador da síntese de serotonina, a hiponocicepção após a estimulação foi completamente abolida, indicando que o sistema serotoninérgico está envolvido na resposta hiponociceptiva após estimulação muscular.

2 JUSTIFICATIVA

O exercício físico é extensivamente prescrito no tratamento de lesões músculo-esqueléticas com o objetivo de reduzir os sintomas (a dor), a recorrência e os custos com seu tratamento; o que torna imprescindível o conhecimento dos mecanismos que regem sua ação.

Apesar de haver diferentes propósitos quanto à utilização do exercício, é cada vez mais reconhecido que ele exerce influência direta na percepção dolorosa. Há um debate considerável sobre o (s) mecanismo (s) de ação da analgesia induzida pelo exercício, os dados disponíveis na literatura são controversos (por exemplo: a reversão de seu efeito analgésico através do pré-tratamento com naloxona). Há evidências de que o exercício pode ser um estímulo suficiente para ativar o sistema opióide (mecanismo opióide), embora não devam ser descartados os mecanismos não-opioides, pois também podem participar do efeito analgésico produzido pelo exercício.

Neste sentido torna-se necessário confirmar os dados relatados na literatura sobre o envolvimento do sistema opióide na analgesia induzida pelo exercício físico e estender os mesmos avaliando outro sistema endógeno de controle da dor, como o sistema serotoninérgico.

Neste sentido, o presente trabalho se propõe investigar o possível efeito hiponociceptivo da natação em camundongos sobre a nocicepção visceral, bem como os mecanismos de ação (receptores opióides e o sistema serotoninérgico) envolvidos neste efeito.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- ✓ Investigar o possível efeito hiponociceptivo da natação sobre a nocicepção visceral, bem como os mecanismos de ação envolvidos neste efeito.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar em qual domínio fisiológico os camundongos se encontram quando submetidos ao protocolo de natação, através da mensuração do nível de lactato sanguíneo;
- ✓ Avaliar a possível atividade hiponociceptiva da natação em camundongos submetidos ao teste de nocicepção química visceral induzida pelo agente flogístico ácido acético;
- ✓ Avaliar a influência da natação sobre a migração de células inflamatórias ocasionadas pela peritonite induzida pelo ácido acético em camundongos;
- ✓ Avaliar se a natação modifica a atividade locomotora dos animais através do teste do campo aberto;
- ✓ Investigar o envolvimento dos receptores opióides sobre a possível atividade hiponociceptiva exercida pela natação em camundongos, através da utilização da naloxona (um antagonista não-seletivo de receptores opióides); ou dos opióides endógenos originados das glândulas adrenais, através da adrenalectomia (retirada bilateral das adrenais) e;
- ✓ Investigar a participação do sistema serotoninérgico no efeito hiponociceptivo exercido pela natação através do tratamento dos camundongos com ρ -clorofenilalanina metil éster (PCPA), um inibidor da enzima triptofano hidroxilase.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos *Swiss* machos (25 a 35 g) obtidos do Biotério Central da UFSC, mantidos em temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ \text{C}$, em ciclo de 12 h claro e 12 h escuro (luzes acesas a partir das 6 horas) e com livre acesso a comida e água. Os animais foram mantidos na sala de experimentos para aclimação por pelo menos 1 h antes da realização dos testes comportamentais, sendo que os experimentos descritos foram realizados de acordo com as normas éticas para o estudo de dor com animais de laboratório (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais utilizados e a intensidade do estímulo nocivo foram os mínimos necessários para demonstrar efeito da possível atividade hiponociceptiva do exercício físico do nado. Além disso, todos os procedimentos experimentais realizados foram submetidos a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (protocolo 00296).

4.2 Protocolo de natação

Os animais foram colocados em uma caixa plástica contendo aproximadamente 35 litros de água, medindo 540 x 390 x 325 mm, dividida com acrílico, em oito compartimentos de 170 x 110 mm cada (Figura 6). A água foi mantida aquecida a 37°C . Sabão líquido foi acrescentado (1 ml por compartimento, totalizando 8 ml - 229 $\mu\text{l/l}$) reduzindo, desta forma, a tensão superficial da água, evitando o comportamento de 'boiar'. Após cada sessão de natação os animais foram gentilmente secos com toalhas de tecido.

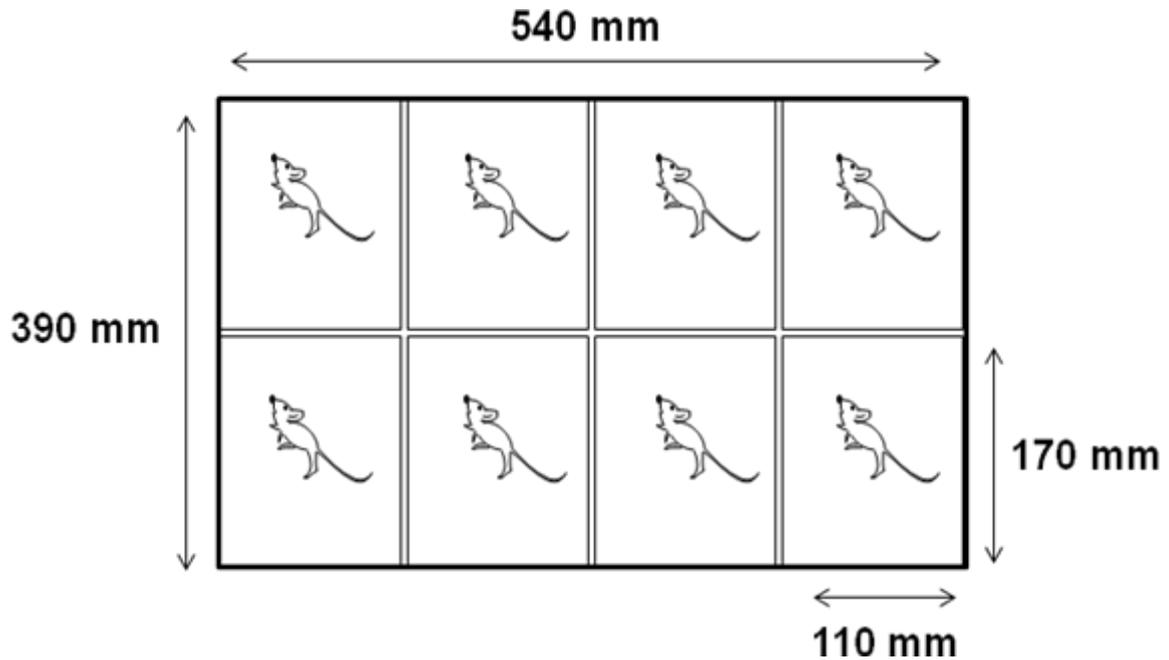


Figura 6. Representação da caixa plástica utilizada pelos camundongos para prática da natação. O recipiente apresentava as seguintes medidas: 540 x 390 x 325 mm; era dividido com acrílico em oito compartimentos de 170 x 110 mm cada. Fonte: a autora.

O protocolo de exercício (natação) utilizado neste trabalho foi adaptado do descrito por Kuphal, Fibuch e Taylor (2007). No primeiro dia o grupo exercitado foi submetido a duas sessões de natação com duração de 30 segundos cada, intervaladas por 120 minutos de repouso. No segundo dia foram realizadas mais duas sessões de 2 minutos de duração com repouso de 120 minutos. No terceiro dia foram realizadas 3 sessões de nado com duração de 10 minutos, intervaladas por um período de 5 minutos de repouso. No quarto dia os animais foram submetidos a duas sessões de 15 minutos, intervaladas por 5 minutos de repouso. A partir do quinto dia até o sétimo dia de exercício, os animais nadaram por 30 minutos contínuos (sem repouso) (Tabela 1).

Tabela 1. Protocolo de natação.

Dia (s)	Tempo exercício (min)	Repouso (min)	Sessões*	Tempo Exercício (min)
1	½	120	2	1
2	2	120	2	4
3	10	5	3	30
4	15	5	2	30
5	30	0	1	30
6	30	0	1	30
7	30	0	1	30

* Equivalente ao número de sessões realizadas (exercício mais período de repouso). Adaptado de Kuphal, Fibuch e Taylor, 2007.

No oitavo dia (24 h após a última sessão de exercício) os camundongos foram submetidos aos testes comportamentais, como mostra a figura 7.

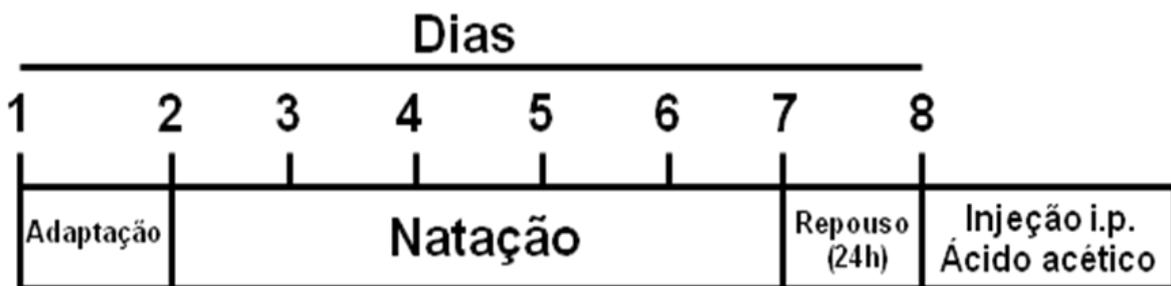


Figura 7. Esquema demonstrando o protocolo de natação e o dia que o teste nociceptivo foi realizado.

4.3 Determinação do domínio fisiológico em relação à intensidade de esforço

Com o objetivo de determinar o domínio fisiológico em relação à intensidade de esforço (moderado, pesado ou severo) induzida pelo protocolo de natação do presente estudo, a concentração sanguínea de lactato foi mensurada na última sessão de exercício: em repouso, e então em 10, 20 e 30 minutos durante a natação, através da retirada de 25 µl de sangue da cauda dos animais (FERREIRA et al., 2007). As amostras sanguíneas foram coletadas com o auxílio de tubos capilares heparinizados e, separadamente, armazenadas em Eppendorfs contendo 50µl de fluoreto de sódio (1%). Para evitar a diluição do lactato sanguíneo com água residual da cauda dos animais os camundongos foram secos com uma toalha imediatamente antes da coleta sanguínea. As concentrações de lactato foram determinadas através do

analisador de lactato (YSI Modelo 2700 SELECT, Yellow Springs, OH, USA). Antes de cada teste o equipamento foi calibrado de acordo com as instruções do fabricante. O procedimento acima descrito foi realizado nos seguintes grupos: Não-exercitado - que nadou apenas 30 segundos por dia e que no último dia foi submetido a 30 minutos de natação e o grupo exercitado - submetido ao protocolo de exercício descrito anteriormente.

4.4 Nocicepção visceral induzida pelo ácido acético

O efeito hiponociceptivo da natação foi verificado no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Este teste é descrito como um modelo típico de nocicepção inflamatória visceral e permite avaliar a atividade antinociceptiva de terapias ou substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico (KOSTER, ANDERSON, de BEER, 1959; VINEGAR et al., 1979; TJØLSEN e HOLE, 1997).

A administração de ácido acético por via intraperitoneal provoca irritação da membrana serosa, o que ocasiona movimentos estereotipados, os quais são caracterizados por contração da musculatura abdominal (contorções abdominais), juntamente com a extensão de uma das patas posteriores (COLLIER et al., 1968; SANTOS et al., 1999; LE BARS, GOZARIU, CADDEN, 2001).

A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6%) diluído em solução salina (NaCl 0,9%). Após a injeção do agente flogístico, os animais foram individualmente colocados em recipientes de vidro, em forma de cone, de aproximadamente 20 cm de diâmetro. As contrações da musculatura abdominal (Figura 8) foram contadas cumulativamente por um período de 20 minutos. O número total das contorções foi indicativo de nocicepção visceral. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: Não-exercitado e exercitado (Figura 9).

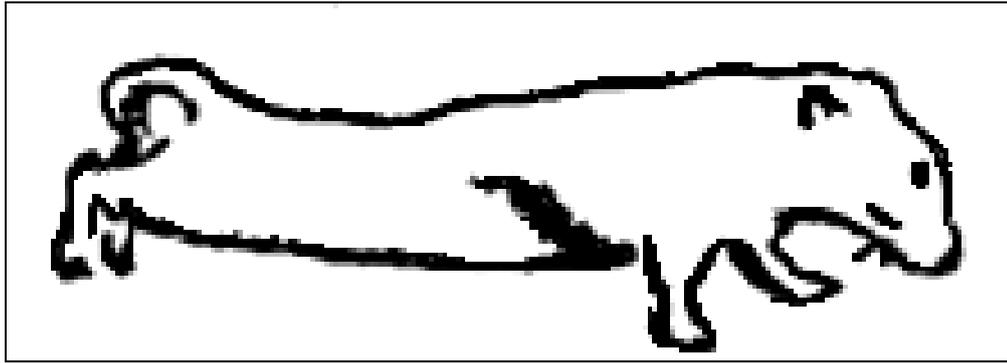


Figura 8. Contorção abdominal típica, com contração da musculatura abdominal e estiramento dos membros posteriores, comportamento avaliado no teste de nociceção química visceral induzida pelo ácido acético. Fonte: Adaptado de GIAMBERARDINO et al., 1995.

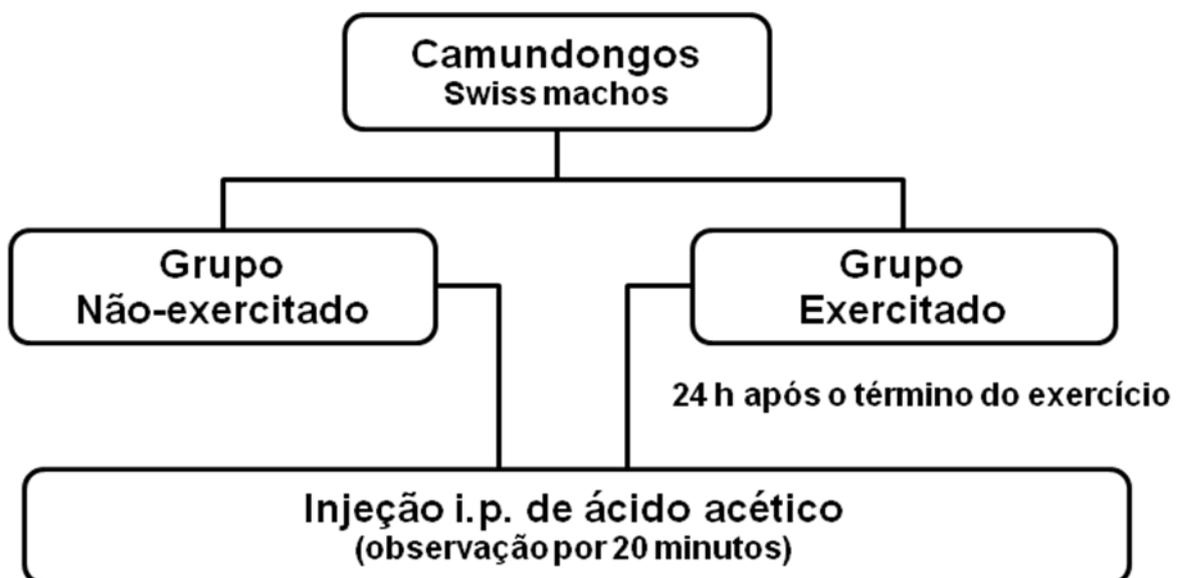


Figura 9. Esquema ilustrativo dos grupos utilizados no teste de nociceção induzida pelo ácido acético.

Além disso, os animais foram submetidos à natação sempre no período da manhã e os testes comportamentais foram realizados na manhã seguinte, fornecendo, assim, um período de 24 h de repouso. Desta forma, este intervalo de tempo minimiza um fator que poderia influenciar na resposta sensorial dos animais, que é a antinociceção induzida pelo estresse, que geralmente ocorre na ordem de minutos e não de horas após a realização do exercício (SCHWARZ, KINDERMANN, 1992).

4.4.1 Avaliação do decurso temporal da hiponocicepção induzida pela natação

Com o objetivo de observar o decurso temporal da hiponocicepção induzida pela natação, em outra série de experimentos, foi avaliado quando se inicia o efeito hiponociceptivo induzido por esse exercício. Para este fim, os animais foram submetidos ao protocolo de natação e transcorridos os tempos de: 2h, 6h, 12h e 24h após o término do protocolo, os animais receberam injeção de ácido acético (0,6%) e o número de contorções abdominais foi avaliada conforme descrito anteriormente.

4.4.2 Controle para o possível estresse da submissão do camundongo a água aquecida

A fim de encontrar o melhor controle para os experimentos e eliminar as possíveis fontes estressoras do estudo, inicialmente, utilizamos 2 grupos controles: controle 1 (Não-exercitado) grupo de animais que nadou somente por um período de 30 segundos, 1 vez por dia durante 7 dias, e o controle 2 (Não-exercitado) grupo de animais que permaneceu por 30 minutos em água rasa aquecida (com os pés apoiados no fundo do recipiente plástico) 1 vez por dia durante 5 dias, ambos foram gentilmente secos e a resposta sensorial (nociceptiva) foi avaliada 24 h após o último contato dos animais com a água.

4.4.3 Avaliação da permeabilidade capilar peritoneal

Em experimentos separados, camundongos foram injetados intravenosamente com azul de Evans a 2,5% (25 mg/ml), usado como marcador da permeabilidade capilar (LUCENA et al., 2007). Após o período de 1 h, os animais receberam uma injeção de ácido acético (i.p.). Transcorridos 20 minutos, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e a cavidade peritoneal foi lavada com 1.5 ml de salina estéril e heparina (25 IU/ml), o volume do lavado peritoneal foi coletado com pipeta automática. A contagem de leucócitos totais foi realizada através de microscopia óptica usando a câmara de Neubauer após diluir a amostra do fluido peritoneal com solução de Türk (1:20). 100 µl da amostra foi centrifugado a 800 rpm por 5 minutos para confecção de lâminas que possibilitaram a contagem de células diferenciais (poli e mononuclear), as mesmas foram coradas com hematoxilina-eosina. Uma amostra do fluido coletado 200µl foi lido a 620 nm

com o leitor de ELISA. A permeabilidade dos capilares peritoneais induzida pelo ácido acético foi expressa em termos de coloração ($\mu\text{g/ml}$) que extravasou para a cavidade peritoneal de acordo com a curva padrão de azul de Evans (LUCENA et al., 2007).

4.5 Mensuração da atividade locomotora

Com o intuito de excluir qualquer efeito locomotor inespecífico causado pelo exercício, a atividade locomotora foi avaliada. O comportamento de ambulação foi avaliado no teste do campo aberto (RODRIGUES et al., 2002; ROSA et al., 2003). O aparato consistiu de uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm. O chão da arena foi dividido em 12 quadrados iguais. No início de cada teste o camundongo foi colocado no canto direito da caixa e foi permitido que o animal explorasse livremente a arena.

O número de quadrados cruzados com todas as patas foi contabilizado por seis minutos. Entre os testes, o aparato foi limpo com uma solução de etanol a 10%. Dois grupos de animais foram utilizados neste experimento: Não-exercitado e exercitado.

4.6 Análise dos possíveis mecanismos de ação do efeito hiponociceptivo induzido pela natação

Com o objetivo de investigar os mecanismos através dos quais a natação induz hiponocicepção, os camundongos foram tratados com diferentes fármacos (antagonistas ou inibidores enzimáticos, como ilustra a figura 10 ou submetidos à cirurgia, como demonstra a figura 11). A escolha das doses para cada fármaco foi baseada em dados da literatura ou em experimentos preliminares realizados em nosso laboratório.



Figura 10. Protocolo utilizado para a investigação do envolvimento dos receptores opióides e serotonina endógena sobre o efeito hiponociceptivo da natação no teste de nociceção induzida pelo ácido acético. As administrações foram realizadas por via i.p. A naloxona foi administrada 20 min antes do teste nociceptivo. O PCPA foi administrado por 4 dias consecutivos, 30 min antes das 4 últimas sessões de natação.



Figura 11. Protocolo utilizado para a investigação do envolvimento dos opióides endógenos liberados pelas glândulas adrenais sobre o efeito hiponociceptivo da natação no teste de nociceção induzida pelo ácido acético. Ambas as glândulas adrenais foram removidas (adrenalectomia) ou não (falso-operado) através de uma incisão dorsal. Uma semana depois, os animais foram submetidos ao protocolo de natação e 24h depois receberam uma injeção i.p. de ácido acético.

4.6.1 Envolvimento dos receptores opióides

Para investigar a influência dos receptores opióides sobre o efeito hiponociceptivo induzido pela natação, camundongos não-exercitados, exercitados ou tratados com morfina foram pré-tratados com naloxona (1mg/kg, i.p.), um antagonista não seletivo de receptores opióides ou salina (10 mg/kg, i.p.). Após 20 minutos os animais receberam injeção intraperitoneal de ácido acético. As contorções abdominais foram registradas durante 20 minutos (SANTOS et al., 2005).

4.6.2 Envolvimento dos opióides endógenos liberados pelas glândulas adrenais

No intuito de averiguar o envolvimento dos opióides endógenos liberados pelas glândulas adrenais sobre o efeito hiponociceptivo causado pela natação, os animais foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg, i.p.) e ketamina (80 mg/kg, i.p.), e ambas glândulas adrenais foram removidas através de uma incisão dorsal, como descrito na literatura (VAZ et al., 1996; SANTOS et al., 1999). Após o procedimento cirúrgico, os animais retornaram para suas caixas com livre acesso a comida e água. Entretanto, a água foi substituída por salina mantendo, desta forma, a concentração fisiológica de sódio no plasma. Decorrido o período de 7 dias os animais operados e ou falso-operados foram submetidos ao protocolo de natação e foi analisado a possível reversão do efeito hiponociceptivo desse exercício em relação à nocicepção visceral induzida pelo ácido acético. Neste experimento, os seguintes grupos de animais foram utilizados: Não-exercitado; Não-exercitado/falso-operado (animais submetidos à incisão dorsal, entretanto, suas glândulas adrenais permaneceram intactas); Não-exercitado/adrenalectomizado (ambas adrenais foram removidas através de uma incisão dorsal); exercitado e adrenalectomizados/exercitado.

4.6.3 Envolvimento do sistema serotoninérgico

Visando avaliar o possível envolvimento de serotonina endógena no efeito hiponociceptivo induzido pela natação, animais não-exercitados ou exercitados foram pré-tratados com ρ -clorofenilalanina metil éster (PCPA, 100 mg/kg, i.p., um inibidor da síntese de serotonina) ou com salina (10 mg/kg, i.p.), uma vez por dia por 4 dias consecutivos. Então, 24h após a última administração de PCPA ou injeção de salina os animais foram submetidos ao teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (SANTOS et al., 2005; SANTOS et al., 1999).

4.7 Reagentes

As seguintes substâncias foram utilizadas: morfina hidrocloreto, ácido acético (Merk, Darmstadt, Alemanha); naloxona hidrocloreto, ρ -clorofenilalanina metil éster (PCPA), fluoreto de sódio, azul de Evans, xilazina e ketamina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). Os fármacos foram dissolvidos em solução de salina isotônica (NaCl 0.9%) imediatamente antes do uso. Os fármacos foram administrados pelas vias: intraperitoneal e subcutânea.

4.8 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm Erro Padrão da Média. Comparações entre grupos experimentais e controle foram realizadas pelo teste-*t*, anova de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls ou duas vias seguida pelo teste de Tukey HSD quando apropriado. Foi considerado significativo o valor de $P < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 Domínio fisiológico em relação à intensidade de esforço (domínio severo)

A escolha do protocolo utilizado no presente estudo se deve ao fato de que o mesmo foi um dos primeiros protocolos na literatura a demonstrar o efeito da natação sobre a redução da nocicepção inflamatória e neuropática periférica em roedores. Além disso, os autores não se preocuparam em determinar o domínio fisiológico em relação à intensidade de esforço no qual este protocolo se enquadra. Assim, o presente trabalho se propôs a fazê-lo.

No entanto, encontramos algumas limitações, pois, para determinar a máxima fase estável de lactato (MFEL), um dos principais requisitos que se faz necessário para a determinação do domínio fisiológico, é a realização da natação com diferentes sobrecargas de trabalho. Contudo, não seria possível, visto que o protocolo não utiliza sobrecarga nos animais durante os 7 dias de natação. Assim, optou-se em analisar o nível de lactato sanguíneo somente com uma intensidade (a intensidade na qual os camundongos nadaram diariamente) e determinar se o nível de lactato sanguíneo está acima ou abaixo da MFEL.

Observou-se que não houve diferença significativa nos níveis sanguíneos de lactato entre os grupos não-exercitado e exercitado. Isso sugere que o protocolo de natação não induziu mudanças metabólicas suficientes para alterar o metabolismo do lactato (produção e remoção de lactato) em relação aos animais não-exercitados. Além disso, encontramos um aumento no nível de lactato sanguíneo superior a 1 mmol/L entre o 10º e o 30º minuto de natação (de 3.43 ± 0.57 para 7.84 ± 1.40 mmol/L, respectivamente), sugerindo que os camundongos realizaram exercício acima da MFEL (Tabela 2) (BENEKE et al., 2003; MADER, HECK, 1986).

Desta forma, de acordo com os domínios proposto por Gaesser e Poole (1996) em relação à intensidade de esforço, sugere-se que este protocolo de natação está no domínio severo. Pois no domínio severo não existe fase estável de lactato sanguíneo, com este se elevando durante todo o tempo de esforço, até que o indivíduo entre em exaustão.

Tabela 2: Determinação dos níveis de lactato sanguíneo.

Tempo (minutos)	Não-exercitado	Exercitado
0	2.37 ± 0.19 mmol/L	2.31 ± 0.14 mmol/L
10	3.85 ± 0.66 mmol/L	3.43 ± 0.57 mmol/L
20	4.78 ± 1.98 mmol/L	5.46 ± 1.18 mmol/L
30	7.13 ± 0.91 mmol/L	7.84 ± 1.40 mmol/L

Tabela 2: Não-exercitado – porém no último dia foram submetidos à natação por 30 minutos e Exercitado. Os pontos avaliados foram: no repouso (0), 10, 20 e 30 minutos após o início da última sessão de exercício. Cada tempo representa a média de 8 animais e o Erro Padrão da Média (E.P.M.). Comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste-*t*.

5.2 Natação induz hiponocicepção no modelo de nocicepção visceral causada pelo ácido acético

5.2.1 Natação induz hiponocicepção dependente do tempo após o exercício

Os resultados apresentados na Figura 12 demonstram o decurso temporal da hiponocicepção induzida pelo protocolo de natação, após a última sessão de exercício em camundongos submetidos ao teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Podemos observar que houve significativa diminuição do número das contorções abdominais nos tempos de: 12h e 24h após o exercício, com inibições de 43±10 e 45±4%, respectivamente.

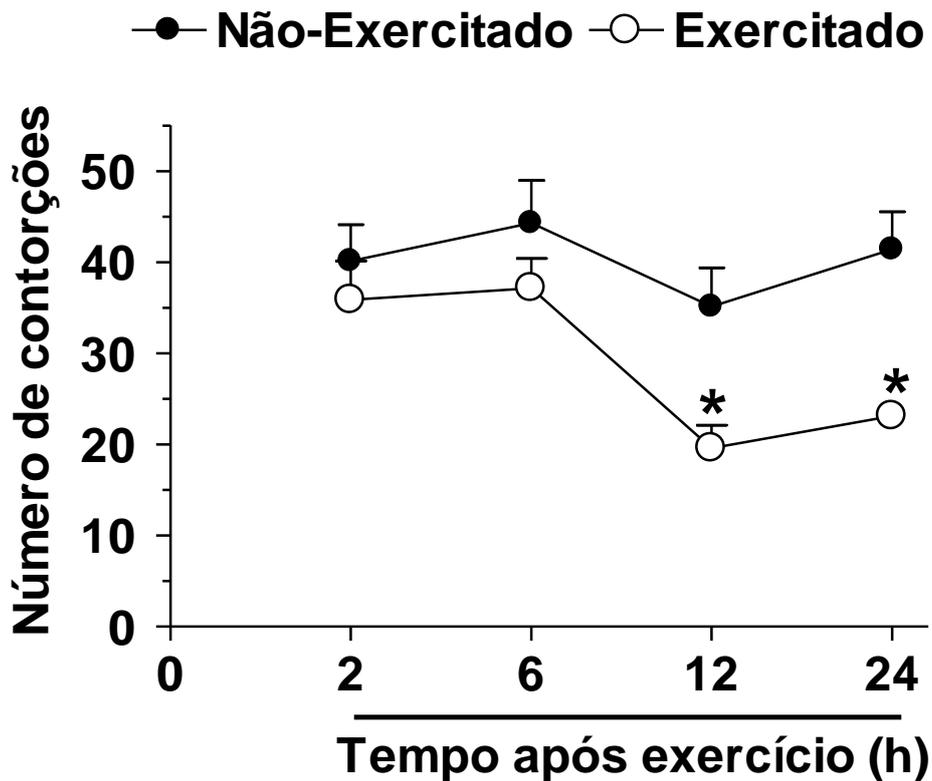


Figura 12: Decurso temporal da hiponociceção induzida pela natação no modelo de nociceção visceral causada pelo ácido acético em camundongos. Cada ponto representa a média de 8 animais e as barras verticais indicam o Erro Padrão da Média (E.P.M.). Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparado ao grupo não-exercitado. * $P < 0.05$, comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste- t .

A partir deste experimento, o tempo escolhido para realização dos demais experimentos foi 24 h após a última sessão de natação.

5.2.2 Controle para o possível estresse da submissão dos camundongos a água aquecida

A figura 13 demonstra que a natação reduz a nociceção visceral induzidas pelo ácido acético em camundongos quando comparados ao grupo não-exercitado, com inibição de $44 \pm 3\%$. Observamos também que os dois grupos controle: controle 1 (não-exercitado) submetidos há 30 segundos diários a natação e o controle 2 (não-exercitado) submetidos há 30 minutos na água rasa aquecida apresentaram respostas similares. Por este motivo, nos demais experimentos utilizamos somente o controle 1 (não-exercitado) como grupo controle.

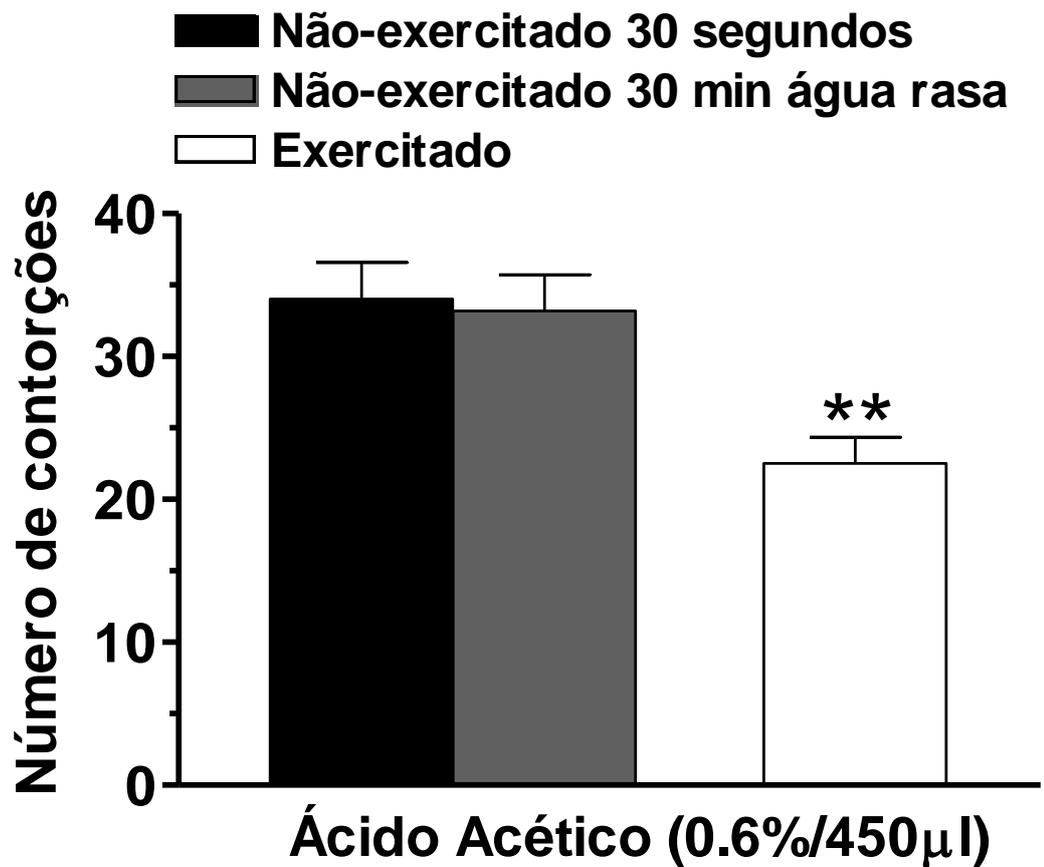


Figura 13: Hiponociceção induzida pela natação no modelo de nociceção visceral causada pelo ácido acético em camundongos. A primeira coluna representa o grupo de animais que permaneceu 30 segundos em contato com a água; a segunda coluna representa o grupo de animais que permaneceu por 30 minutos na água rasa e a terceira coluna representa o grupo de animais exercitados. Cada coluna representa a média de 8 animais e as barras indicam o Erro Padrão da Média (E.P.M.). Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparados ao grupo não-exercitado. ** $P < 0.01$, ANOVA de uma via seguida pelo teste Newman-Keuls.

5.2.3 Natação não altera parâmetros de permeabilidade capilar peritoneal

Os resultados apresentados na figura 14 demonstram que a natação, nas mesmas condições que causou inibição da nociceção induzida pelo ácido acético, em camundongos, não alterou a migração celular (Figura 14A, 14B e 14C) nem o extravasamento do azul de Evans induzido pelo ácido acético, quando comparado ao grupo não-exercitado (Figura 14D).

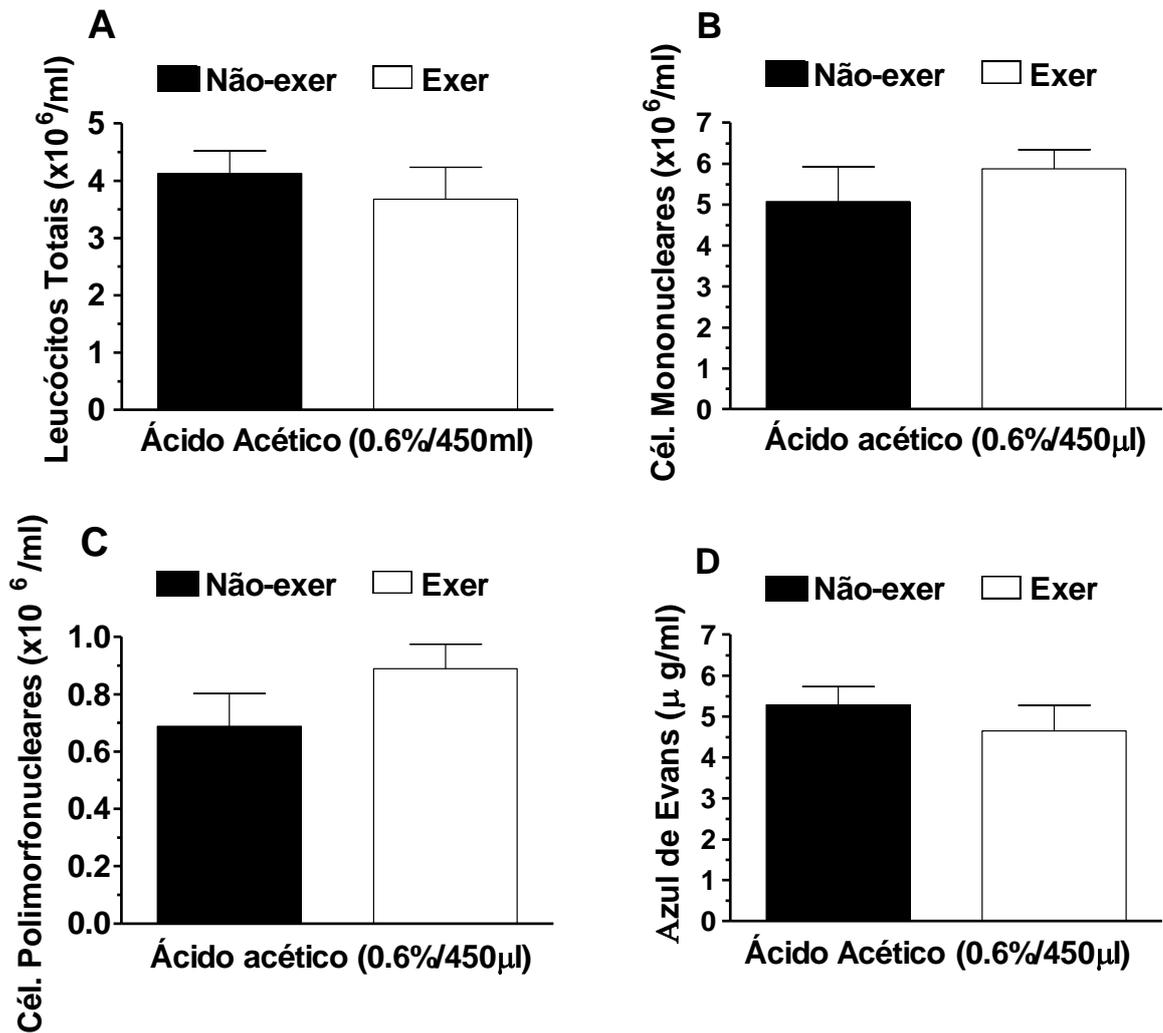


Figura 14. Efeito da natação sobre: infiltração de leucócitos totais (A), células mononucleares (B), polimorfonucleares (C) e extravasamento do azul de Evans (D), induzidos pelo ácido acético (0,6%, i.p.) em camundongos. Cada coluna representa a média de 8 animais e as barras indicam o Erro Padrão da Média (E.P.M.). ANOVA de uma via seguida pelo teste Newman-Keuls. Não-exercitado (Não-exer) e exercitado (exer).

5.3 Natação não modifica a atividade locomotora dos camundongos

Podemos observar pela figura 15 que a natação não foi capaz de afetar a atividade locomotora no campo aberto quando comparamos os grupos: não-exercitado e exercitado. A média \pm E.P.M. do número de cruzamentos foi de 74.4 ± 7 e 82.7 ± 4 para o grupo não-exercitado e exercitado, respectivamente.

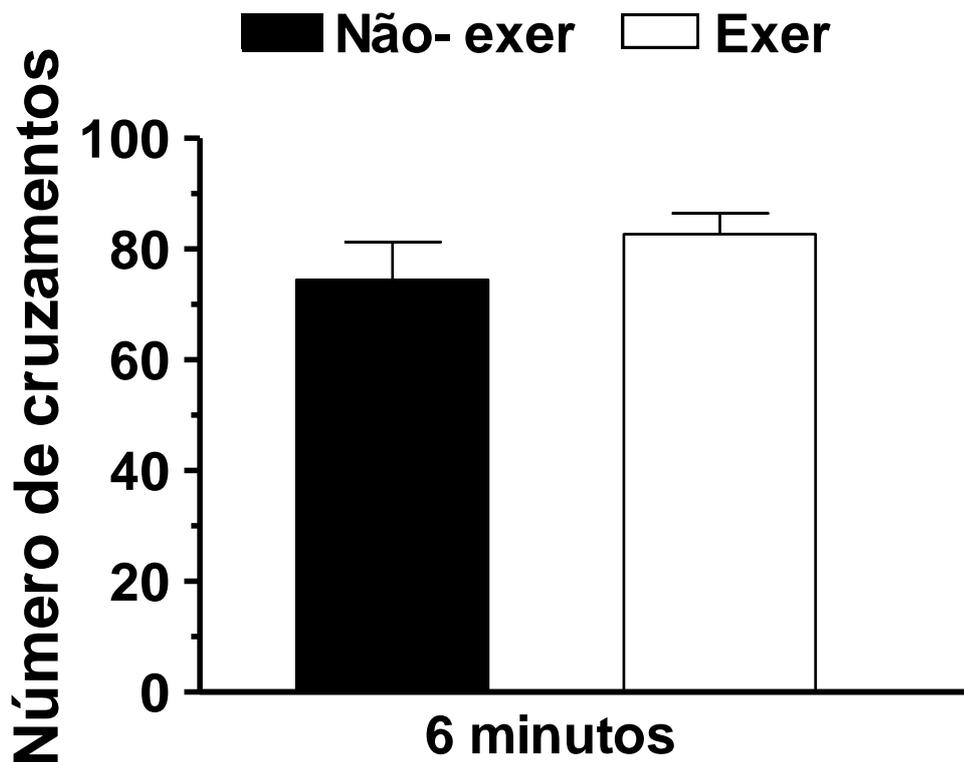


Figura 15. Avaliação da atividade locomotora dos camundongos submetidos à natação evidenciada pelo número de cruzamentos no teste do campo aberto. Cada coluna representa a média de 8 animais e as barras indicam o Erro Padrão da Média (E.P.M.). Comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste-*t*. Não-exercitado (Não-exer) e exercitado (exer).

5.4 Receptores opióides estão envolvidos na hiponociceção induzida pela natação

A fim de demonstrar o envolvimento dos receptores opióides no efeito hiponociceptivo induzido pela natação os animais foram pré-tratados com naloxona (1mg/kg, i.p., um antagonista não-seletivo de receptores opióides), este fármaco foi administrado 20 min. antes da última sessão de exercício (Figura 16).

A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas entre pré-tratamento com naloxona [$F(1,27)=2.30$; $p<0.05$], grupo exercitado [$F(1,27)=14.92$; $p<0.001$] e a interação pré-tratamento naloxona x grupo exercitado [$F(1,27)=6.16$; $p<0.05$]. A análise *post-hoc* indicou que o pré-tratamento dos camundongos com naloxona reverteu ($p<0.05$) o efeito hiponociceptivo causado pela natação (Figura 16). Sob as mesmas condições, a naloxona significativamente reverteu o efeito antinociceptivo exercido pela morfina (2.5 mg/kg, s.c., usada como controle positivo) [$F(1,27)=354.74$; $p<0.001$].

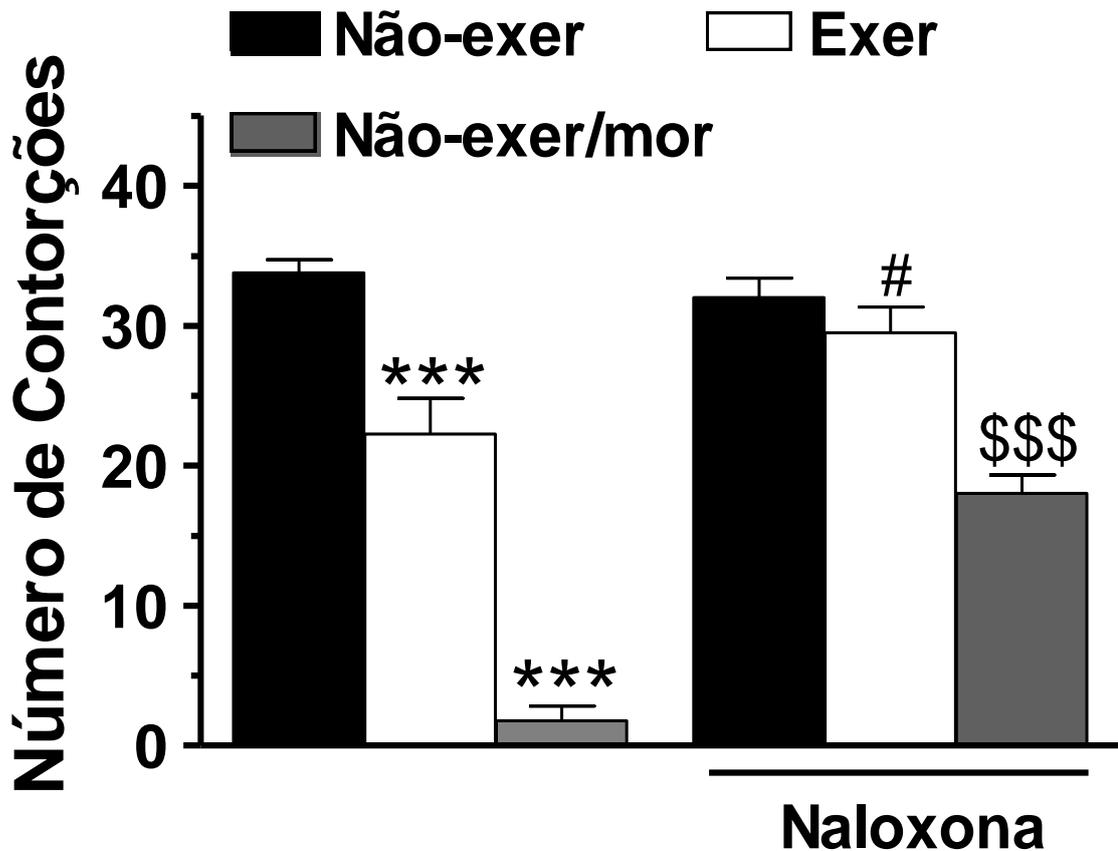


Figura 16. Pré-tratamento dos animais com naloxona (1mg/kg, i.p.) sobre o efeito hiponociceptivo da natação e da morfina (2,5 mg/kg, subcutânea) no modelo de nocicepção visceral induzida pelo ácido acético em camundongos. A primeira coluna representa os animais não exercitados, a segunda representa os animais exercitados; a terceira indica os animais tratados com morfina, que após 30 minutos receberam injeção i.p. de ácido acético. A quarta coluna é composta pelo grupo de animais não-exercitado que receberam naloxona e 30 minutos após receberam injeção i.p. de ácido acético. Na quarta e quinta colunas estão representadas as reversões pela naloxona dos efeitos hiponociceptivos da natação e da morfina, respectivamente. Cada coluna representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o Erro padrão da Média (E.P.M.). Os símbolos denotam os níveis de significância $***P < 0.001$ quando comparados ao grupo não-exercitado; $$$$P < 0.001$ quando comparados ao grupo não-exercitado pré-tratados com morfina e $^{\#}P < 0.05$, quando comparado a natação pré-tratado com salina, ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey HSD. Não-exercitado (Não-exer), exercitado (exer) e Não-exercitado/morfina (Não-exer/mor).

5.4.1 Opióides endógenos liberados das glândulas adrenais também estão envolvidos na hiponocicepção induzida pela natação

Os resultados mostrados na Figura 17 mostram que a cirurgia de adrenalectomia realizada nos animais não afetou significativamente a resposta sensorial em camundongos não-exercitados [$F(1,29)=2.41$; $p<0.13$] quando administrado ácido acético. A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas entre a adrenalectomia bilateral [$F(1,29)=8.16$; $p<0.01$], grupo exercitado [$F(1,29)=4.57$; $p<0.05$] e interação adrenalectomia x grupo exercitado [$F(1,29)=20.16$; $p<0.001$]. A análise *post-hoc* indicou que a adrenalectomia bolateral reverteu ($p<0.001$) o efeito hiponociceptivo ocasionado pelo nado.

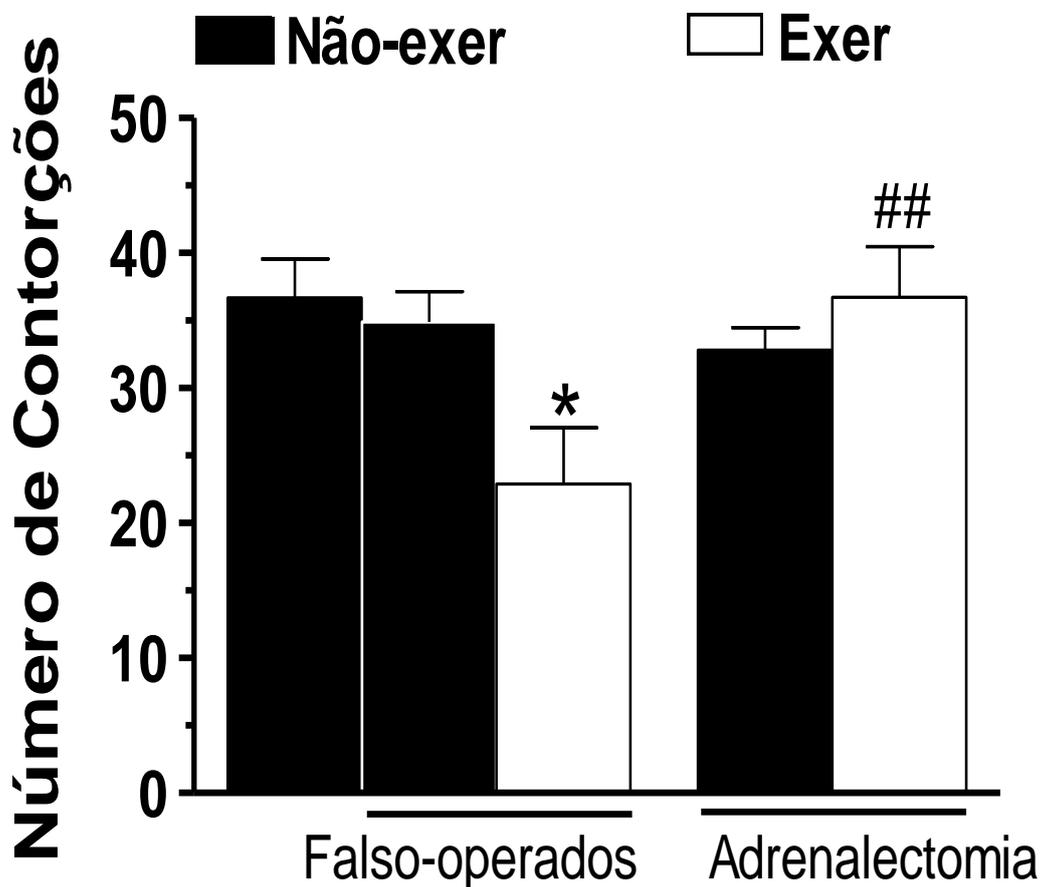


Figura 17: Efeito da adrenalectomia bilateral sobre a hiponocicepção induzida pela natação no modelo de nocicepção visceral causada pelo ácido acético. A primeira coluna representa os animais não-exercitados, a segunda representa os animais não-exercitados/falso-operados e a terceira representa os animais exercitados/falso-operados; a quarta coluna representa o grupo de animais não-exercitado que sofreram adrenalectomia; a quinta representa os animais que sofreram adrenalectomia e foram exercitados. Todos os animais receberam injeção de ácido acético no peritônio. Cada coluna representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o Erro Padrão da Média (E.P.M.). O símbolo denota o nível de significância $*P < 0.05$ quando comparado ao grupo não exercitado/falso-operado, ANOVA de duas vias seguida pelo teste Tukey HSD.

5.5 Envolvimento da serotonina endógena na hiponociceção induzida pela natação

Os resultados mostrados na Figura 18 indicam que o pré-tratamento dos animais com PCPA (100 mg/kg, i.p., por 4 dias consecutivos) reverteu completamente o efeito hiponociceptivo induzido pela natação. Nas mesmas condições a PCPA significativamente reverteu a antinociceção causada pela morfina (2.5 mg/kg, s.c., usado como controle positivo) [$F(1,30)=154.62$; $p<0.01$]. A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas do pré-tratamento com PCPA [$F(1,31)=11.00$; $p<0.01$], grupo exercitado [$F(1,31)=23.52$; $p<0.001$] e interação entre pré-tratamento com PCPA x grupo exercitado [$F(1,31)=18.23$; $p<0.001$]. A análise post-hoc indicou que o pré-tratamento dos animais com PCPA reverteu ($p<0.001$) o efeito antinociceptivo causado pelo nado.

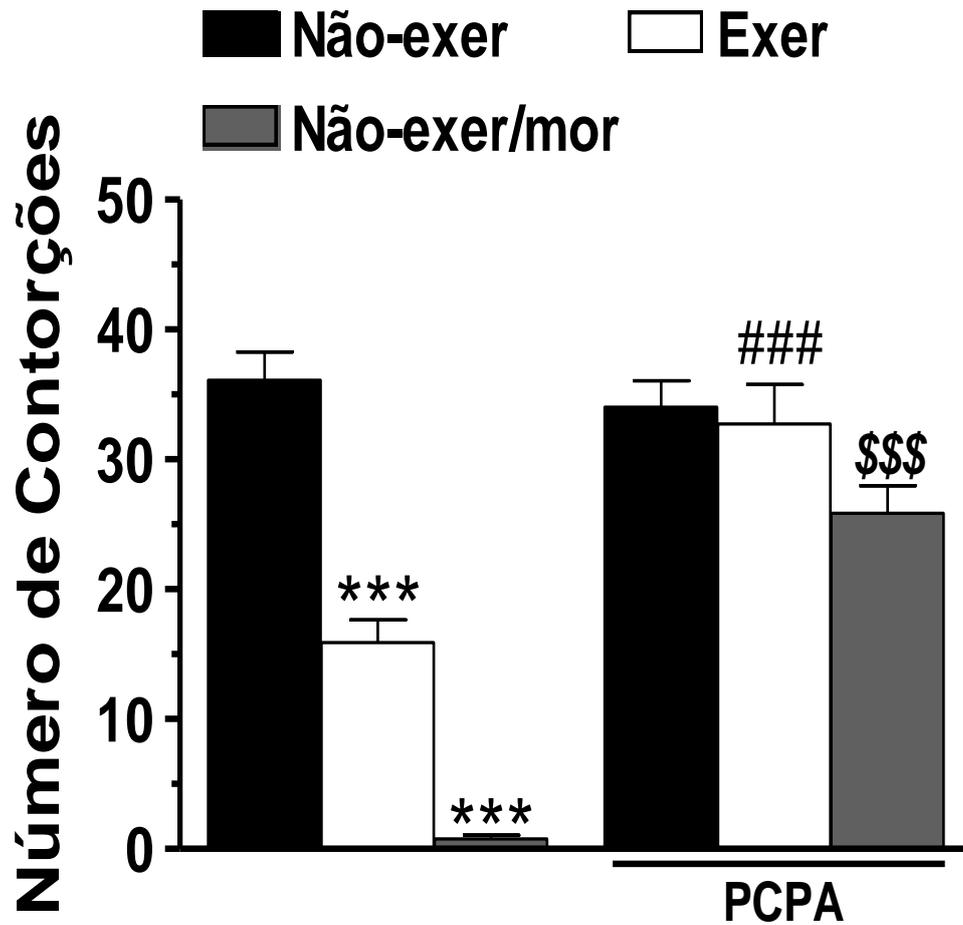


Figura 18. Pré-tratamento dos animais com PCPA (100 mk/kg, i.p., uma vez ao dia, por quatro dias consecutivos) sobre a hiponociceção induzida pela natação no modelo de nocicepção visceral causada pelo ácido acético. A primeira coluna indica os animais não-exercitados; a segunda representa os animais exercitados; a terceira indica os animais que receberam morfina e 30 minutos após o ácido acético foi administrado i.p.; a quarta coluna é representativa dos animais não-exercitados que receberam o tratamento com PCPA e a quinta e sexta demonstram as reversões do tratamento com PCPA nos animais que realizaram exercício e que receberam a morfina, respectivamente. Cada coluna representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o Erro Padrão da Média (S.E.M.). Os símbolos denotam os níveis de significância $***P < 0.001$ quando comparados ao grupo não-exercitado; $####P < 0.001$ quando comparados ao grupo exercitado pré-tratados com salina e $$$$P < 0.001$ quando comparados ao grupo não-exercitado pré-tratados com morfina. ANOVA de duas via seguida pelo teste de Tukey HSD. Não-exercitado (Não-exer), exercitado (exer) e Não-exercitado/morfina (Não-exer/mor).

6 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados aqui demonstram, pela primeira vez, que o exercício prolongado de alta intensidade (domínio severo) produz efeito hiponociceptivo sobre o modelo de nocicepção química visceral em camundongos. Os achados mais relevantes do presente trabalho foram que, (1) a natação de alta intensidade reduz a resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético e (2) o efeito hiponociceptivo causado pela natação foi significativamente revertido pelo pré-tratamento intraperitoneal dos animais com naloxona (um antagonista não-seletivo de receptores opióides), PCPA (inibidor da triptofano hidroxilase) e pela adrenalectomia bilateral. Nossos dados sustentam a hipótese que a natação de alta intensidade (no domínio severo) produz efeito hiponociceptivo no modelo de nocicepção visceral aguda através da ativação de receptores opióides, e do sistema serotoninérgico.

6.1 Natação produz hiponocicepção no modelo de nocicepção visceral aguda

Os resultados relatados aqui indicam que a natação em camundongos, na intensidade que não causou qualquer disfunção motora ou qualquer efeito colateral detectável, produziu marcante hiponocicepção visceral quando avaliada no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético.

O teste de contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético é um modelo relativamente simples, com pouca especificidade, mas de fácil observação, rápido e com boa sensibilidade a várias drogas analgésicas e antiinflamatórias não-esteroidais, bem como a drogas semelhantes à morfina e outros analgésicos que atuam centralmente. Além disso, os resultados obtidos com as várias classes de drogas analgésicas neste modelo mostram boa correlação com a ação analgésica encontrada em outros modelos pré-clínicos, bem como, em estudos clínicos (KOSTER, ANDERSON, de BEER, 1959; BLANE, 1967; BLUMBERG, WOLF, DAYTON, 1965; SIEGMUND, CADMUS, LU, 1957 a, b).

Entretanto, sabe-se que a administração de ácido acético na cavidade peritoneal de camundongos promove a liberação de muitos mediadores pró-inflamatórios e/ou pró-nociceptivos, tais como, prostaglandinas, bradicininas, substância P, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1- β (IL-1 β), interleucina-8 (IL-8), dentre outras (COLLIER et al., 1968; RIBEIRO et al., 2000; IKEDA et al., 2001). Estas substâncias estimulam os neurônios aferentes primários nociceptivos aumentando a liberação de glutamato e aspartato no fluido cérebro-espinhal (FENG, CUI, WILLIS, 2003; ZHU et al., 2004).

Dessa forma, o resultado obtido neste trabalho sugere que o efeito hiponociceptivo da natação pode estar relacionado tanto à inibição da liberação de mediadores pró-inflamatórios, induzidos pelo ácido acético; quanto ao aumento da produção de mediadores antiinflamatórios tais como: interleucina 6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) e IL-8 (OSTROWSKI, SCHJERLING, PEDERSEN, 2000; OSTROWSKI et al., 1999; PEDERSEN, FISCHER, 2007).

Neste sentido, a primeira citocina presente na circulação durante o exercício é a IL-6 e seu aparecimento precede às outras citocinas, atualmente ela é considerada um fator induzido pelo exercício. O músculo esquelético expressa esta citocina de forma aguda e a IL-6 derivada do músculo contribui para um marcante aumento de sua concentração sistêmica. Dados recentes indicam que os efeitos agudos da IL-6 não são pró-inflamatórios, mas antiinflamatórios e que esta citocina deve desempenhar importantes papéis na mediação dos efeitos benéficos do exercício (PEDERSEN, FISCHER, 2007).

A atividade antiinflamatória da IL-6 pode ser evidenciada porque quando ocorre um aumento desta interleucina no plasma induzido pelo exercício ele é seguido por um aumento dos níveis circulantes de proteínas antiinflamatórias, como: antagonista do receptor para interleucina 1 (IL-1ra) e interleucina 10 (IL-10) (OSTROWSKI, SCHJERLING, PEDERSEN, 2000; OSTROWSKI et al., 1999); corroborando com o dado anterior, ambos, exercício e infusão da IL-6, suprimem a produção de TNF- α em humanos (STARKIE et al., 2003).

Levando em consideração que o músculo esquelético é o maior órgão do corpo humano, o descobrimento da contração muscular como produtora e liberadora de citocinas (também denominadas miocinas, como exemplo: IL-6 e IL-8) cria um novo paradigma: o músculo esquelético como um órgão endócrino (PEDERSEN, FISCHER, 2007).

As miocinas devem estar envolvidas nos efeitos benéficos à saúde proporcionados pelo exercício, e fornecem importantes papéis na proteção contra doenças associadas a um

baixo grau de inflamação, tais como: doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, sintomas relacionados a síndromes metabólicas e câncer (PEDERSEN, FISCHER, 2007).

Dados da literatura têm mostrado que antiinflamatórios tais como, dexametasona, que inibe os múltiplos genes que codificam moléculas e enzimas pró-inflamatórias, inibe a produção de citocinas que são ativadas durante o processo inflamatório. Também, a indometacina, uma droga antiinflamatória não-esteroidal, inibe a produção de prostaglandinas originada do ácido aracônico, pela inibição da enzima ciclooxigenase (COX) (MOURA et al., 2001; BARNES, 2006).

Além disso, nosso grupo demonstrou que a resposta inflamatória, caracterizada pela infiltração de leucócitos e aumento da permeabilidade capilar, causada pela injeção de ácido acético em camundongos, é inibida pela dexametasona e indometacina (SMIDERLE et al., 2008). Assim, os nossos resultados indicam que a natação, na mesma condição que causa hiponocicepção, não foi capaz de reduzir a infiltração de leucócitos e a aumentada permeabilidade capilar (extravasamento do azul de Evans) induzidas pelo ácido acético em camundongos. Neste sentido, nossos dados sugerem que a natação mostra um efeito hiponociceptivo, independente de uma atividade antiinflamatória, no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

Este resultado já era esperado, visto que, o tempo determinado no presente estudo para analisar o efeito hiponociceptivo da natação (24h após a última exposição dos animais a água) foi escolhido propositalmente para descartar o efeito antinociceptivo e/ou antiinflamatório da liberação de corticosteróides endógenos induzida pela natação (HOHMANN et al., 2005). Neste sentido, tem sido demonstrado que a antinocicepção induzida pelo estresse (AIE), que ocorre principalmente em água fria (via corticosteróides endógenos), ocorre dentro de minutos após o nado, e não após horas (SCHWARZ, KINDERMANN, 1992).

6.2 Natação produz hiponocicepção através da ativação de receptores opióides

Os mecanismos endógenos que impedem o desenvolvimento da dor estão bem estabelecidos no encéfalo e medula espinhal e consistem de vias inibitórias descendentes da dor que contêm principalmente peptídeos opióides, noradrenalina, serotonina e seus receptores (WILLER, DEHEN, CAMBIER, 1981; TERMAN et al., 1984; AKIL et al., 1998). Todavia, pouco se sabe sobre os mecanismos regulatórios que ocorrem na periferia. Tais

efeitos são produzidos por citocinas antiinflamatórias e pelas interações entre peptídeos opióides derivados de leucócitos e terminais nociceptivos periféricos (MACHELSKA, STEIN, 2002; STEIN, SCHÄFER, MACHELSKA, 2003).

Os receptores opióides periféricos são sintetizados no gânglio da raiz dorsal (GRD) e são transportados retrogradamente para os terminais dos nervos sensoriais periféricos. Eles pertencem à classe dos receptores acoplados a proteína G. Quando ativados por ligantes opióides eles se acoplam a proteínas G inibitórias (Gi/o) que ocasionam a inibição dos canais de sódio e cálcio e diminuem o nível neuronal do monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) (MACHELSKA, STEIN, 2006).

Consistente com esses efeitos, os opióides atenuam a excitabilidade dos nociceptores, propagação dos potenciais de ação e liberação de neuropeptídeos pró-inflamatórios excitatórios como: substância P e peptídeo relacionado ao gene calcitonina dos nociceptores, resultando em antinocicepção ou analgesia (STEIN, SCHÄFER, MACHELSKA, 2003).

Contudo, na inflamação periférica ocorre um aumento na síntese (no GRD) e transporte retrógrado dos receptores opióides, resultando na sua *up-regulation*. Além disso, é evidenciado um aumentado acoplamento a proteína G nos terminais nervosos periféricos. (JI et al., 1995; MOUSA et al., 2001; ZÖLLNER et al., 2003). Também é observado, um aumento no número de nociceptores ativados e um rompimento na barreira perineural, o que facilita o acesso dos agonistas opióides aos seus receptores. Todos esses efeitos levam a uma aumentada eficácia analgésica dos opióides nos seus receptores periféricos durante o processo inflamatório (STEIN, SCHÄFER, MACHELSKA, 2003).

Além disso, os receptores opióides (μ , κ e δ) estão localizados em vários níveis da transmissão da nocicepção, sendo responsáveis por ações antinociceptivas diretas e indiretas dos agonistas opióides (MILLAN, 1999; 2002).

Nos experimentos realizados neste trabalho, observa-se que a morfina (agonista opióide) aplicada por via subcutânea apresentou atividade antinociceptiva pronunciada na nocicepção visceral causada pelo ácido acético, e que o tratamento prévio dos animais com naloxona (antagonista opióide não seletivo) na dose que não produziu efeito “*per se*”, reverteu completamente a antinocicepção induzida pela morfina. Os nossos dados também mostram claramente que a naloxona, na mesma condição que foi eficaz em reverter à ação da morfina, reverteu de maneira significativa o efeito hiponociceptivo causado pela natação na nocicepção visceral induzida pelo ácido acético.

Esses resultados permitem sugerir que o sistema opióide está envolvido na mediação do efeito hiponociceptivo da natação. Nossos achados corroboram com dados da literatura que propõem fortemente o envolvimento do sistema opioidérgico como responsável pela resposta antinociceptiva evidenciada após exercício físico (OLAUSSON et al., 1986; JANAL et al., 1984). Entretanto, estudos adicionais são necessários para indicar qual o tipo (s) de receptor (es) que está (ao) participando deste efeito.

6.3 Opióides endógenos liberados das glândulas adrenais também estão envolvidos na hiponocicepção induzida pela natação

Também tem sido demonstrado que as células cromafins da medula adrenal de várias espécies de mamíferos estocam e liberam peptídeos opióides (VIVEROS et al., 1979; YOSHIMASA et al., 1982; NORTH, EGAN, 1973). Além disso, as endorfinas são sintetizadas principalmente no hipotálamo, glândula hipófise anterior e nervos espinhais (GOLDFARB, JAMURTAS, 1997).

Beta-endorfinas podem ser liberadas na circulação pela glândula hipófise ou em áreas encefálicas através de fibras nervosas (GOLDFARB, JAMURTAS, 1997). No entanto, existe uma intensidade e duração adequadas de exercício necessárias para induzir o aumento nos níveis de beta-endorfinas circulantes. Neste sentido, foi demonstrado que é necessário realizar exercício físico com consumo máximo de oxigênio ($VO_2 \text{ max}$) > 60% para aumentar os níveis de beta-endorfinas circulantes (GOLDFARB et al., 1990).

A β -endorfina é um peptídeo de 31 aminoácidos e foi descoberta por Li, em 1977. Tem uma potente atividade opióide e, em comparação com as encefalinas, apresenta maior resistência à degradação enzimática (SCHWARZ, KINDERMANN, 1992). A β endorfina é primariamente sintetizada na glândula hipófise anterior e derivada da pró-opiomelanocortina (POMC), seu precursor molecular, por meio das enzimas PC1 e PC2 (pró-hormônio convertase) (WEI et al., 2003; ZHOU et al., 1999). Ela pode ser liberada na circulação pela hipófise anterior ou projetada para áreas do encéfalo por meio das fibras nervosas (GOLDFARB, JAMURTAS, 1997), tendo como receptores principais δ e μ (NARITA, TSENG, 1998) e meia-vida plasmática de aproximadamente 20 minutos (HEITKAMP, HUBER, SCHEIB, 1996).

Ainda não estão totalmente compreendidos os mecanismos que controlam a secreção da β -endorfina, mas tem sido sugerido que o estresse e o exercício físico têm um

papel importante nesse processo. Em condições normais ela apresenta concentrações muito baixas, de apenas $1-100 \times 10^{-12}\text{M}$; embora, sob condições de estresse, como no exercício físico, aumentem 3 a 10 vezes (PEDERSEN, HOFFMAN-GOETZ, 2000). Tem-se sugerido que as alterações das concentrações da β -endorfina em resposta ao exercício são volume/intensidade dependentes.

O balanço ácido-base (pH ou níveis de ácido láctico) tem sido sugerido como mecanismo para o incremento da β -endorfina durante o exercício, isso foi evidenciado por Schwarz e Kindermann (1992), neste trabalho o exercício realizado por humanos provocou aumento nos níveis de β -endorfina na circulação periférica, predominantemente relacionados ao aumento na concentração de lactato. Outro fator que pode estimular sua produção de β -endorfina durante o exercício é o metabolismo ou a glicorregulação (CUNHA, RIBEIRO, OLIVEIRA, 2008).

Alguns de seus efeitos são muito importantes para o treinamento, como analgesia, maior tolerância ao lactato ou ao excesso de bases (GOLDFARB, JAMURTAS, 1997), diminuição da percepção do esforço, diminuição do desconforto muscular e respiratório (SGHERZA et al., 2002) e euforia do exercício (HEITKAMP, HUBER, SCHEIB, 1996).

Há dados na literatura demonstrando a hiponocicepção induzida pelo nado realizado em diferentes temperaturas, tanto em ratos, como em camundongos. A hiponocicepção foi demonstrada após 3.5 minutos de nado a 2°C (BODNAR et al., 1978), 3 minutos de nado a 20°C (WILLOW, CARMODY, CARROLL, 1980) e 3 minutos de nado a 32°C (CHRISTIE, CHESHER, BIRD, 1981). Com base nesses dados poderíamos imaginar que o nado seria o principal estímulo para a produção da hiponocicepção; entretanto, quando o nado realizado em água fria e em água morna foram comparados observou-se que diferentes mecanismos estão atuando nesses efeitos. O'Connor e Chipkin (1984) mostraram que a hiponocicepção induzida pelo nado na água fria não é revertida pela administração de naloxona, enquanto que o efeito produzido pelo nado em água morna foi revertido pela administração de naloxona.

No presente trabalho, investigou-se também a participação das glândulas adrenais (fonte endógena de peptídeos opióides) no efeito hiponociceptivo induzido pela natação. Nossos resultados demonstram que a retirada bilateral das glândulas adrenais (adrenalectomia) não alterou a resposta nociceptiva visceral dos animais operados. Entretanto observou-se que a adrenalectomia bilateral reverteu significativamente o efeito hiponociceptivo induzido pela natação. Estes resultados sugerem que os peptídeos opióides

liberados pelas glândulas adrenais participam do efeito hiponociceptivo induzido pela natação.

6.4 Envolvimento do sistema serotoninérgico

A serotonina (5-HT) é um dos principais neurotransmissores amplamente distribuídos no sistema nervoso central. Está bem estabelecido que as vias serotoninérgicas dentro do sistema nervoso central se originam de uma série de núcleos localizados na linha média do tronco encefálico, os chamados núcleos da rafe. Estes núcleos representam a mais rica fonte de serotonina neuronal sintetizada no encéfalo de mamíferos (FIELDS, HEINRICHER, MASON, 1991, MEOTTI et al., 2009). O núcleo dorsal da rafe tem sido implicado nos efeitos regulatórios de antidepressivos nos transtornos de humor (ARTIGAS et al., 1996), bem como na modulação da dor (MILLAN, 2002) e o núcleo magno da rafe é provavelmente o núcleo serotoninérgico mais importante em modular o controle descendente da transmissão da dor (BASBAUM, FIELDS, 1984; MILLAN, 2002).

O sistema serotoninérgico rafe-espinhal se projeta do bulbo ventromedial rostral, incluindo o núcleo magno da rafe, através do funículo dorsolateral para o corno dorsal da medula espinal através de fibras não-mielinizadas, modulando sensações dolorosas (OLESON, TWOMBLY, LIEBESKIND, 1978; AZAMI, LLEWELYN, ROBERT, 1982; BRODIE, PROUDFIT, 1984; LIGHT, CASALE, MENETREY, 1986; BASBAUM et al., 1988; MILLAN, 2002).

Entretanto o papel exercido pela 5-HT nos mecanismos de processamento nociceptivo na medula espinal é controverso. Apesar da ação antinociceptiva dos agonistas de receptores 5-HT_{1A} (BARDIN et al., 2001; JEONG, CHOI, YOON, 2004), ambas funções: pró-nociceptiva (ALI et al., 1996; GREEN, SCARTH, DIECKENSON, 2000; ZEITZ et al., 2002; OATWAY, CHEN, WEAVER, 2004) e antinociceptiva (GLAUM, PROUDFIT, ANDERSON, 1990; ALHAIDER, LEI, WILCOX, 1991; PAUL et al., 2001) foram obtidas a partir de estudos com os subtipos de receptores 5-HT₃.

Vários subtipos de receptores para 5-HT foram identificados na medula espinal (HOYER et al., 1994; KAWAMATA et al., 2003) atuando tanto em sítios pré-, quanto pós-sinápticos (HORI, ENDO, TAKAHASHI, 1996; HOU et al., 2001; WU et al., 2001; MEUSER et al., 2002) de neurônios excitatórios e inibitórios (ALHAIDER, LEI, WILCOX, 1991; ZHANG et al., 2002; CONTE et al., 2005).

Contudo, tem sido sugerido que o exercício físico ocasiona um aumento na disponibilidade de neurotransmissores encefálicos como, por exemplo, dopamina, noradrenalina e serotonina que tipicamente estão reduzidos em pacientes depressivos (PIERCE, KUPPART, HARRY, 1979). Ademais, estudos envolvendo animais (DUNN et al., 1996) e humanos (AAN HET ROT, COLLINS, FITTERLING, 2009) indicam que o exercício aumenta os níveis de serotonina encefálica. Desta forma, os mecanismos que fundamentam os efeitos antidepressivos do exercício são similares aos que fundamentam os efeitos hiponociceptivos da natação obtidos no presente estudo.

Esta afirmação é suportada pela observação de que a depleção de serotonina endógena com PCPA, inibidor da triptofano hidroxilase, em dose capaz de diminuir os níveis encefálicos de serotonina e reverter a antinocicepção causada pela morfina (SANTOS et al., 1999; MENDES et al., 2000), foi capaz de reverter de maneira significativa o efeito hiponociceptivo da natação. Entretanto, estudos futuros com os antagonistas seletivos dos receptores serotoninérgicos são importantes para determinar os subtipos de receptores envolvidos na hiponocicepção induzida pelo exercício.

Neste sentido, tem sido observado que o músculo esquelético consome aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) e o consumo destes aminoácidos encontra-se aumentado durante o exercício (NEWSHOLME, BLOMSLRAND, 1995). Desta forma, a concentração sanguínea destes AACR tende a diminuir. Os AACR entram no encéfalo usando o mesmo carreador do triptofano, o peptídeo precursor da serotonina. Assim, se a concentração dos AACR diminui sem alterar os níveis de triptofano, uma quantidade maior de triptofano entrará no encéfalo. Tem sido mostrado que exercício físico prolongado exerce dois efeitos sobre a disponibilidade de triptofano encefálico: (1) diminuindo a concentração dos AACR, alterando a razão triptofano-AACR que entra no encéfalo, em favor do triptofano e (2) elevando os níveis de ácidos graxos no sangue. O aumento dos ácidos graxos no sangue causa um aumento da razão do triptofano livre versus ligado a albumina, que, por sua vez, aumenta a quantidade de triptofano que entra no encéfalo. O nível aumentado de triptofano encefálico leva a um aumento dos efeitos da transmissão serotoninérgica (NEWSHOLME, BLOMSLRAND, 1995).

Estudos demonstram que durante o exercício físico de longa duração, dois eventos contribuem para o maior influxo de triptofano pela barreira hematoencefálica. A captação muscular dos AACR para serem oxidados para fins energéticos, concomitantemente à queda da glicemia. Com a redução da competição na barreira hematoencefálica, aumentaria a captação de triptofano e seu influxo encefálico (DAVIS, 1995). Da mesma maneira, com a

continuação do exercício físico, o organismo também começa a mobilizar para fins energéticos ácidos graxos (AGL) do tecido adiposo. Os AGL competem pelo transporte com o triptofano, sendo que esta competição pelos locais de ligação da albumina faz com que ocorra maior disponibilidade de triptofano livre (CURZON, KNOTT, 1974). Neste sentido, o sinergismo entre deslocamento da parcela livre, mediada por AGL, e menor competição, mediada pela redução plasmática dos AACR, tem como consequência maior produção de serotonina cerebral.

Trabalhos utilizando diálise intracerebral mostram que o exercício físico aumenta a concentração de serotonina extracelular em várias áreas encefálicas, incluindo: hipocampo e córtex (WILSON, MARSDEN, 1996; MEEUSEN et al., 2001). Dois diferentes mecanismos podem estar envolvidos neste efeito. Como revisado por Jacobs e Fornal (1999) a atividade motora aumenta as taxas de disparo de neurônios serotoninérgicos, resultando em um aumento na liberação e síntese de serotonina (RUETER, JACOBS, 1996). Além disso, há um aumento no nível de triptofano no encéfalo, que persiste após o exercício físico (CHAOULOFF et al., 1986).

Dados da literatura demonstraram uma possível interação entre os sistemas serotoninérgico e opioide. No SNC, neurônios serotoninérgicos estão envolvidos na inibição da dor induzida por agonistas opióides. Além disso, aumento na taxa de liberação de serotonina dentro da medula espinal de ratos perfundida ocorreu quando morfina foi injetada dentro da substância cinzenta periaquedutal (HAMON et al., 1991; HAUBRICH et al., 1984; FÜRST, 1999).

Em resumo, os resultados aqui apresentados fornecem evidências convincentes de que a natação prolongada de alta intensidade exerce pronunciado efeito hiponociceptivo no teste de contorção abdominal induzida pelo ácido acético. Além disso, estes experimentos são os primeiros a demonstrar que este efeito hiponociceptivo é mediado pela ativação de receptores opióides e do sistema serotoninérgico. Além disso, os opióides endógenos liberados pelas glândulas adrenais também estão envolvidos neste efeito (Figura 19).

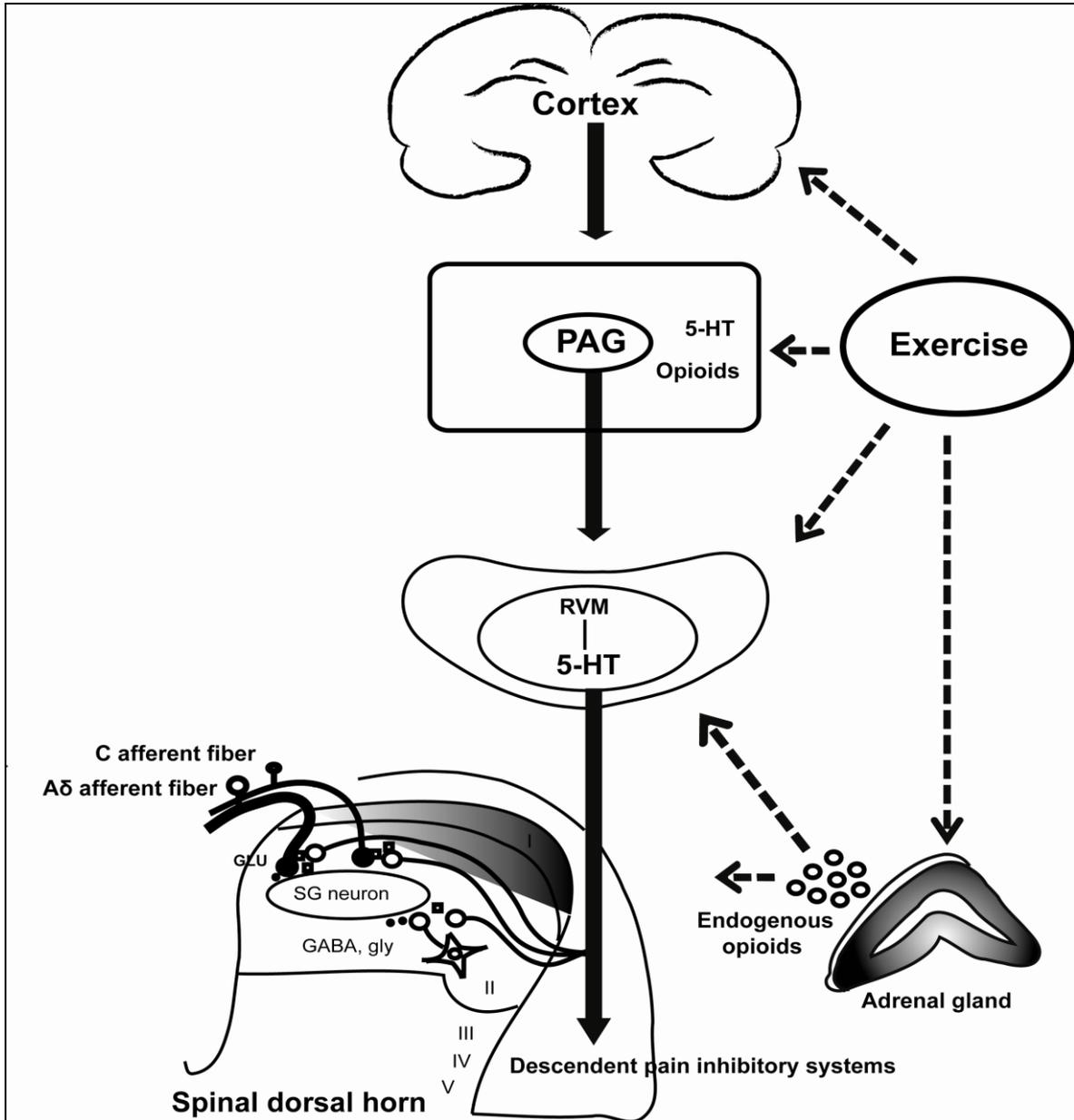


Figura 19. Prováveis mecanismos envolvidos no efeito hipnocéptico do exercício físico. O presente estudo demonstra que o efeito hipnocéptico induzido pelo exercício físico (natação) é dependente dos sistemas serotoninérgico e opioidérgico. Fonte: a autora.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho constata que o protocolo de natação aplicado no presente estudo, em camundongos, foi capaz de:

- * Demonstrar que este protocolo de exercício encontra-se no domínio severo; acima da Máxima Fase de Lactato, através da mensuração do nível de lactato sanguíneo;
- * Produzir uma diminuição da nocicepção visceral induzida pelo ácido acético em camundongos;
- * Entretanto, não alterou a migração de células inflamatórias ocasionadas pela peritonite induzida pelo ácido acético em camundongos e nem a atividade locomotora dos animais.
- * Demonstrar o envolvimento dos receptores opióides sobre a atividade hiponociceptiva exercida pela natação, através da utilização da naloxona (antagonista não seletivo dos receptores opióides);
- * Evidenciar que as glândulas adrenais também estão envolvidas na atividade hiponociceptiva do nado através da realização da adrenalectomia (remoção bilateral das adrenais);
- * Comprovar a participação do sistema serotoninérgico no efeito hiponociceptivo da natação através do tratamento dos camundongos com ρ -clorofenilalanina metil éster (PCPA), um inibidor da enzima triptofano hidroxilase;

Enfim, estes dados confirmam que o exercício físico pode contribuir como uma abordagem terapêutica no controle da dor e nos dão indícios dos mecanismos de ação que regem seus efeitos.

REFERÊNCIAS

AAN HET Rot, M.; COLLINS, K. A.; FITTERLING, H. L. Physical exercise and depression. **The Mount Sinai Journal of Medicine**. v. 76, n. 2, p. 204-214. 2009.

AKIL, H., et al. Endogenous opioids: overview and current issues. **Drug and Alcohol Dependence**. v. 51, n. 1, p. 127-140. 1998.

AL-CHAER, E. D., et al. Visceral nociceptive input into the ventral posterolateral nucleus of the thalamus: a new function for the dorsal column pathway. **Journal of Neurophysiology**. v. 76, n. 4, p. 2661-2674. 1996.

ALHAIDER, A. A.; LEI, S. Z.; WILCOX, G. L. Spinal 5-HT₃ receptor-mediated antinociception: possible release of GABA. **The Journal of Neuroscience**. v. 11, n. 4, p.1881-1888. 1991.

ALI, Z., et al. The role of 5HT₃ in nociceptive processing in the rat spinal cord: results from behavioural and electrophysiological studies. **Neuroscience Letters**. v. 208, n. 3, p. 203-207. 1996.

ARTIGAS, F., et al. Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists. **Trends in Neurosciences**. v. 19, n. 9, p. 378-383. 1996.

AZAMI, J.; LLEWELYN, M. B.; ROBERT, M. H. The contribution of nucleus reticularis paragigantocellularis and nucleus raphe magnus to the analgesia produced by systemically administered morphine, investigated with the microinjection technique. **Pain**. v. 12, n. 3, p. 229-246. 1982.

AZIZ, Q., et al. Cortical processing of human somatic versus visceral sensation. **Journal of Neuroscience**. v. 20, n. 1, p. 2657-2663. 2000.

BARDIN, L., et al. In the formalin model of tonic nociceptive pain, 8-OH-DPAT produces 5-HT_{1A} receptor-mediated, behaviorally specific analgesia. **European Journal of Pharmacology**. v. 421, n. 2, p. 109-114. 2001.

BARNES, P. J. How corticosteroids control inflammation: quintiles prize lecture 2005. **British Journal of Pharmacology**. v. 148, n. 3, p. 245-254. 2006.

BASBAUM, A. I., et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**. v. 139, n. 2, p. 267-284. 2009.

BASBAUM, A. I. et al. The fiber caliber of 5-HT immunoreactive axons in the dorsolateral funiculus of the spinal cord of the rat and cat. **Somatosensory Research**. v. 5, n. 3, p. 177-185. 1988.

BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annual Review of Neuroscience**. v. 7, n. 1, p. 309-338. 1984.

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

BEMENT, M. K.; SLUKA, K. A. Low-intensity exercise reverses chronic muscle pain in the rat in a naloxone-dependent manner. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**. v. 86, n. 9, p. 1736-1740. 2005.

BENEKE, R., et al. Effect of Test Interruptions on blood lactate during constant workload testing. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. v. 35, n. 9, p.1626-1636. 2003.

BENEKE, R. Methodological aspects of maximal lactate steady state: implications for performance testing. **European Journal of Applied Physiology**. v. 89, n. 1, p. 204-214. 2003.

BENSON, C. J.; SUTHERLAND, S. P. Toward an understanding of the molecules that sense myocardial ischemia. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 940, n. 1, p. 96-109. 2001.

BERTHOUD, H. R.; NEUHUBER, W. L. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. **Autonomic Neuroscience**. v. 85, n. 1, p. 1-17. 2000.

BIELEFELDT, K.; OZAKI, N.; GEBHART, G. F. Experimental ulcers alter voltage-sensitive sodium currents in rat gastric sensory neurons. **Gastroenterology**. v. 122, n. 2, p. 394-405. 2002.

BLACKSHAW, L. A.; GEBHART, G. F. The pharmacology of gastrointestinal nociceptive pathways. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 2, n. 1, p. 642-649. 2002.

BLANE, G. F. Blockade of bradykinin induced nociception in the rat as a test for analgesic drugs with particular reference to morphine antagonists. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 19, n. 6, p. 367-373.1967.

BLUMBERG, H.; WOLF, P. S.; DAYTON, H. B. Use of the writhing test for evaluating analgesic activity of narcotic antagonists. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 118, n. 1, p. 763-766. 1965.

BODNAR, R. J. Endogenous opiates and behavior: 2007. **Peptides**. v. 29, n. 12, p. 2292-2375. 2008.

BODNAR, R. J., et al. Dose-dependent reductions by naloxone of analgesia induced by cold-water stress. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 8, n. 6, p. 667-672. 1978.

BOOTH, M. L., et al. Physical activity preferences, preferred sources of assistance, and perceived barriers to increased activity among physically inactive Australians. **Preventive Medicine**. v. 26, n. 1, p. 131-137. 1997.

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

BRILEY, M.; MORET, C. Fibromyalgia syndrome: an overview of potential drug targets. **IDrugs: The Investigational Drugs Journal**. v. 6, n. 7, p. 668-673. 2003.

BRODIE, M. S.; PROUDFIT, H. K. Hypoalgesia induced by the local injection of carbachol into the nucleus raphe magnus. **Brain Research**. v. 291, n. 2, p. 337-342. 1984.

BUENO, L., et al. Mediators and pharmacology of visceral sensitivity: from basic to clinical investigations. **Gastroenterology**. v. 112, n. 5, p. 1714-1743. 1997.

BUÉNO, L.; FIORAMONTI, J.; GARCIA-VILLAR, R. Pathobiology of visceral pain: molecular mechanisms and therapeutics implications. III. Visceral afferent pathways: a source of new therapeutic targets for abdominal pain. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**. v. 278, n. 5, p. 670-676. 2000.

CANNING, B. J.; SPINA, D. **Handbook of experimental pharmacology: sensory nerves**. Verlag, Berlin: Springer. v. 194. 2009.

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

CATERINA, M.; JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Annual Review of Neuroscience**. v. 24, n. 1, p. 487-517. 2001.

CERVERO, F. Sensory innervation of the viscera: peripheral basis of visceral pain. **Physiological Reviews**. v. 74, n. 1, p. 95-138. 1994.

CHAOULOFF, F. Physiopharmacological interactions between stress hormones and central serotoninergic system. **Brain Research Reviews**. v. 18, n. 1; p. 1-31. 1993.

CHAOULOFF, F., et al. Motor activity increases tryptophan, 5 hydroxyindoleacetic acid, and homovanillic acid in ventricular cerebrospinal fluid of the conscious rat. **Journal of Neurochemistry**. v. 46, n. 4, p. 1313-1316. 1986.

CHIZH, B. A.; ILLES, P. P2X receptors and nociception. **Pharmacological Reviews**. v. 53, n. 4, p. 553-568. 2001.

CHRISTIE, M. J.; CHESHER, G. B.; BIRD, K. D. The correlation between swim-stress induced antinociception and [3H] leu-enkephalin binding to brain homogenates in mice. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**. v. 15, n. 6, p. 853-857. 1981.

COLLIER, H. O. J., et al. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**. v. 32, n. 2, p. 295-310. 1968.

CONTE, D., et al. Transmitter content, origins and connections of axons in the spinal cord that possess the serotonin (5-hydroxytryptamine) 3 receptor. **Neuroscience**. v. 134, n. 1, p. 165-173. 2005.

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

CUNHA, G. S.; RIBEIRO J. L.; OLIVEIRA, A. R. Níveis de Beta-endorfina em resposta ao exercício e no sobre-treinamento. **Arquivos Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**. v. 54, n. 4, p. 589- 598. 2008.

CURZON, G.; KNOTT, P. J. Effects on plasma and brain tryptophan in the rat of drugs and hormones that influence the concentration of unesterified fatty acid in the plasma. **British Journal Pharmacology**. v. 50, n. 2, p. 197-204. 1974.

DANG, K.; BIELEFELDT, K.; GEBHART, G. F. Gastric ulcers reduce A-type potassium currents in rat gastric sensory ganglion neurons. **American Journal of Physiology**. v. 286, n. 4, p. 573-579. 2004.

DAVIS, J. M. Carbohydrates, branched-chain amino acids, and endurance: the central fatigue hypothesis. **International Journal of Sport Nutrition**. v. 5, n. 1, p. 29-38. 1995.

DISHMAN, R. K., et al. Neurobiology of exercise. **Obesity**. v. 14, n. 3, p. 345-356. 2006.

DUNN, A. L., et al. Brain norepinephrine and metabolites after treadmill training and wheel running in rats. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. v. 28, n. 2, p. 204-209. 1996.

FAUDE, O.; KINDERMANN, W.; MEYER, T. Lactate Threshold Concepts how valid are they ?. **Sports Medicine**. v. 39, n. 6, p. 469-490. 2009.

FENG, Y.; CUI, M.; WILLIS, W. D. Effect of anticonvulsant gabapentin on visceral nociception and its relationship with amino acid neurotransmitters released from spinal cord. **Beijing da Xue Xue Bao**. v. 35, n. 3, p. 307-310. 2003.

FENTEM, P. H. ABC of sports medicine. Benefits of exercise in health and disease. **British Medical Journal**. v. 308, n. 6939, p. 1291-1295. 1994.

FERNSTROM, J. D. Dietary amino acids and brain function. **Journal of the American Dietetic Association**. v. 94, n. 1, p. 71-77. 1994.

FERREIRA, J. B. C., et al. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**. v. 34, n. 8, p. 760-765. 2007.

FIELDS, H. L.; HEINRICHER, M. M.; MASON, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. **Annual Review of Neuroscience**. v. 14, n. 1, p. 219-245. 1991.

FOREMAN, R. D. Mechanisms of cardiac pain. **Annual Review of Physiology**. v. 61, n. 1, p. 143-167. 1998.

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

FULLER, A. K.; ROBINSON, M. E. A test of analgesia using signal detection theory and a within-subjects design. **Perceptual and Motor Skills**. v. 76, n. 3, p. 1299-1310. 1993.

FULLERTON, S. Functional digestive disorders (FDD) in the year 2000 – economic impact. **The European Journal of Surgery. Supplement**. v. 582, n. 1, p. 62-64. 1998.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**. v. 48, n. 2, p. 129-141. 1999.

GAESSER, G. A.; POOLE, D. C. The slow component of oxygen uptake kinetics in human. **Exercise and Sport Sciences Reviews**. v. 24, n. 1, p. 35-70. 1996.

GEBHART, G. F. Pathobiology of visceral pain: molecular mechanisms and therapeutic implications. IV. Visceral afferent contributions to the pathobiology of visceral pain. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**. v. 278, n. 1, p. 834-838. 2000.

GEBHART, G. F., et al. Visceral hypersensitivity. In: Handwerker HO, ed. **Hyperalgesia: molecular mechanisms and clinical implications**. Seattle: IASP Press. p. 87-104. 2004.

GIAMBERARDINO, M. A., et al. Artificial ureteral calculosis in rats: behavioral characterization of visceral pain episodes and their relationship with referred lumbar muscle hyperalgesia. **Pain**. v. 61, n. 3, p. 459-469. 1995.

GLAUM, S. R.; PROUDFIT H. K.; ANDERSON, E. G. 5-HT₃ receptors modulate spinal nociceptive reflexes. **Brain Research**. v. 510, n. 1, p. 12-16. 1990.

GOLDFARB, A. H.; JAMURTAS, A. Z. Beta-endorphin response to exercise. An update. **Sports Medicine**. v. 24, n. 1, p. 8-16. 1997.

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

GOWANS, S. E.; de HUECK, A. Effectiveness of exercise in management of fibromyalgia. **Current Opinion in Rheumatology** . v. 16, n. 2, p. 138-142. 2004.

GREEN, G. M.; SCARTH, J.; DICKENSON, A. An excitatory role for 5-HT in spinal inflammatory nociceptive transmission; state-dependent actions via dorsal horn 5-HT₃ receptors in the anaesthetized rat. **Pain**. v. 89, n. 1, p. 81-88. 2000.

GREENWOOD, B. N.; FLESHNER, M. Exercise, learned helplessness and the stress-resistant brain. **Neuromolecular Medicine**. v. 10, n. 2, p. 81-98. 2008.

HAIER, R. J.; QUAID, K.; MILLS, J. S. C. Naloxone alters pain perception after jogging. **Psychiatry Research**. v. 5, n. 2, p. 231-232. 1981.

HAMON, M. D., et al. The contribution of monoamines and their receptors to pain control. In: Basbaum, A. I.; Besson, J., ed. **Towards a new pharmacotherapy of pain**. Chicester, UK: Wiley. p. 83-102. 1991.

HAUBRICH, D. R., et al. The role of endogenous nonendorphin substances in nociception. In: Kuhar, M.; Pasternak, G., ed. **Analgesics: Neurochemical behavioral and clinical perspectives**. New York: Raven Press. p. 195-234. 1984.

HAYES, K., et al. Forced, not voluntary, exercise effectively induces neuroprotection in stroke. **Acta Neuropathologica**. v. 115, n. 3, p. 289-296. 2008.

HEITKAMP, H. C.; HUBER, W.; SCHEIB, K. Beta-Endorphin and adrenocorticotrophin after incremental exercise and marathon running- female responses. **European Journal on Applied Physiology and Occupational Physiology**. v. 72, n. 5, p. 417-424. 1996.

HOFFMAN, P.; THORÉN, P. Electric muscle stimulation in the hind leg of the spontaneously hypertensive rat induces a long-lasting fall in blood pressure. **Acta Physiologica Scandinavica**. v. 133, n. 2, p. 211-219. 1988.

HOFFMANN, P., et al. Electrical stimulation of the gastrocnemius muscle in the spontaneously hypertensive rat increases the pain threshold: role of different serotonergic receptors. **Acta Physiologica Scandinavica**. v. 138, n. 2, p. 125-131. 1990.

HOGAN, Q. Animal pain models. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**. v. 27, n. 4, p. 385-401. 2002.

HOHMANN, A. G., et al. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. **Nature**. v. 435, n. 7045, p. 1108-1112. 2005.

HOLZER, P. Acid-sensitive ion channels in gastrointestinal function. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 3, n. 6, p. 618-625. 2003.

HORI, Y.; ENDO, K.; TAKAHASHI, T. Long-lasting synaptic facilitation induced by serotonin in superficial dorsal horn neurones of the rat spinal cord. **Journal Physiology**. v. 492, n. 3, p. 867-876. 1996.

HOU, M., et al. 5-HT(1B) and 5-HT(1D) receptors in the human trigeminal ganglion: co-localization with calcitonin gene-related peptide, substance P and nitric oxide synthase. **Brain Research**. v. 909, n. 1, p. 112-120. 2001.

HOYER, D., et al. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). **Pharmacological Reviews**. v. 46, n. 2, p. 157-203. 1994.

HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. The molecular dynamics of pain control. **Nature Reviews. Neuroscience**. v. 2, n. 2, p. 83-91. 2001.

IKEDA, Y., et al. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Science**. v. 69, n. 24, p. 2911-2919. 2001.

IMURA, H.; NAKAI, Y. "Endorphins" in pituitary and other tissues. **Annual Review of Physiology**. v. 43, n. 1, p. 265-278. 1981.

ISHIMATSU, M.; WILLIAMS, J. Y. Synchronous activity in locus coeruleus results from dendritic interactions in pericoerulear regions. **The Journal of Neuroscience**. v. 16, n. 16, p. 5196- 5204. 1996.

JACOBS, B. L.; FORNAL, C. A. Activity of serotonergic neurons in behaving animals. **Neuropsychopharmacology**. v. 21. n. 2, p. 9-15. 1999.

JANAL, M. N., et al. Pain sensitivity, mood, and plasma endocrine levels in man following long distance running: Effects of naloxone. **Pain**. v. 19, n. 1, p. 13-25. 1984.

JÄNIG, W., et al. The role of vagal visceral afferents in the control of nociception. **Progress in Brain Research**. v. 122, n. 1, p. 273-287. 2000.

JEONG, C. Y.; CHOI, J. I.; YOON, M. H. Roles of serotonin receptor subtypes for the antinociception of 5-HT in the spinal cord of rats. **European Journal of Pharmacology**. v. 502, n. 3, p. 205-211. 2004.

JI, R. R., et al. Expression of mu-, delta-, and kappa-opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation. **The Journal of Neuroscience**. v. 15, n. 12, p. 8156-8166. 1995.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**. v. 413, n. 6852, p. 203-210. 2001.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Princípios da Neurociência**. 4. ed. São Paulo: Manole. 2003.

KAWAMATA, T., et al. The activation of 5-HT (3) receptors evokes GABA release in the spinal cord. **Brain Research**. v. 978, n. 1, p. 250-255. 2003.

KELLENBERGER, S.; SCHILD, L. Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. **Physiological Reviews**. v. 82, n. 3, p. 735-767. 2002.

KIRCHNER, A., et al. Left vagus nerve stimulation suppresses experimentally induced pain. **Neurology**. v. 55, n. 8, p. 1167-1171. 2000.

- KOLTYN, K. F. et al. Perception of pain following aerobic exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. v. 28, n. 11, p. 1418-1421. 1996.
- KOLTYN, K. F. Analgesia following exercise: a review. **Sports Medicine**. v. 29, n. 2, p. 85-98. 2000.
- KOLTYN, K. F. Exercise-induced hypoalgesia and intensity of exercise. **Sports Medicine**. v. 32, n. 8, p. 477-487. 2002.
- KOLTYN, K. F.; UMEDA, M. Exercise, hypoalgesia and blood pressure. **Sports Medicine**. v. 36, n. 3, p. 207-214. 2006.
- KOSTER, R.; ANDERSON, M.; de BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**. v. 18, n. 1, p. 412- 416. 1959.
- KUPHAL, K. E.; FIBUCH, E. E.; TAYLOR, B. K. Extended swimming exercise reduces inflammatory and peripheral neurophatic pain in rodents. **The Journal of Pain**. v. 8, n. 12, p. 989-897. 2007.
- LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animals models of nociception. **Pharmacological Reviews**. v. 53, n. 4, p. 597-652. 2001.
- LEVY, C. M.; KOLIN, E.; BERSON, B. L. Cross training: risk or benefit? An evaluation of injuries in four athlete populations. **Sports Medicine Clinic Forum**. v. 3, n. 1, p. 1-8. 1986.
- LIGHT, A. R.; CASALE, E. J.; MENETREY, D. M. The effects of focal stimulation in nucleus raphe magnus and periaqueductal gray on intracellularly recorded neurons in spinal laminae I and II. **Journal of Neurophysiology**. v. 56, n. 3, p. 555-571. 1986.
- LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. **Pain**. v. 137, n. 3, p. 473-477. 2008.
- LUCENA, G. M., et al. Antinociceptive and anti-inflammatory properties from the bulbs of *Cipura paludosa* Aubl. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 112, n. 1, p. 19-25. 2007.
- LYNN, P. A., et al. Rectal intraganglionic laminar endings are transduction sites of extrinsic mechanoreceptors in the guinea pig rectum. **Gastroenterology**. v. 125, n. 3, p. 786-794. 2003.

MACHELSKA, H.; STEIN, C. Immune mechanisms in pain control. **Anesthesia and Analgesia**. v. 95, n. 4, p. 1002-1008. 2002.

MACHELSKA, H.; STEIN, C. Leukocyte-derived opioid peptides and inhibition of pain. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**. v.1, n. 1, p. 90-97. 2006.

MADER, A.; HECK, H. A theory of metabolic origin of the “anaerobic threshold”. **International Journal Sports Medicine**, v. 7, n. 1, p. 45-65. 1986.

MARTINS, M. A., et al. Activation of dorsal periaqueductal gray by glycine produces long lasting hyponociception in rats without overt defensive behaviors. **Life Sciences**. v. 83, n. 3, p. 118-121. 2008.

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

McMAHON, S. B.; KOLTZENBURG, M. **McMahon: Wall and Melzack’s Textbook of Pain**. 5.ed. Churchill, Livingstone: Elsevier. 2006.

MEEUSEN, R.; de MEIRLEIR, K. Exercise and brain neurotransmission. **Sports Medicine**. v. 20, n. 3, p. 160-188. 1995.

MEEUSEN, R., et al. Brain neurotransmitter levels during exercise. **Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin**. v. 52, n. 1, p. 361-368. 2001.

MENDES, G.L., et al. Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by sesquiterpene polygodial. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 292, n. 1, p. 164-172. 2000.

MEUSER, T., et al. 5-HT₇ receptors are involved in mediating 5-HT-induced activation of rat primary afferent neurons. **Life Sciences**. v. 71, n. 19, p. 2279-2289. 2002.

MEOTTI, F. C., et al. Redox modulation at the peripheral site alters nociceptive transmission in vivo. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. v.36, n. 3, p. 272-277. 2009.

MERSKEY, H., et al. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP subcommittee on taxonomy. **Pain**. v. 6, n. 3, p. 249-252. 1979.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**. v. 57, n. 1, p. 1-164. 1999.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**. v. 66, n. 6, p. 355-474. 2002.

MOGIL, J. S. Animal models of pain: progress and challenges. **Nature Reviews Neuroscience**. v. 10, n. 4, p. 283-294. 2009.

MOURA, H. V., et al. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**. v. 16, n. 4, p. 376-387. 2001.

MOUSA, S. A., et al. Beta-endorphin- containing memory-cells and mu-opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue. **Journal of Neuroimmunology**. v. 115, n. 1, p. 71-78. 2001.

MULTON, S.; SCHOENEN, J. Pain control by vagus nerve stimulation: from animal to man . . . and back. **Acta Neurologica Belgica**. v. 105, n. 2, p. 62-67. 2005.

NARITA, M.; TSENG, L. F. Evidence for the existence of the beta-endorphin- sensitive “epsilon-opioid receptor” in the brain: the mechanisms of epsilon-mediated antinociception. **Japanese Journal of Pharmacology**. v. 76, n. 3, p. 233-253. 1998.

NESS, T.J., et al. Low intensity vagal nerve stimulation lowers human thermal pain thresholds. **Pain**. v. 86, n. 1, p. 81-85. 2000.

NESS, T.J. Evidence for ascending visceral nociceptive information in the dorsal midline and lateral spinal cord. **Pain**. v. 87, n. 1, p. 83-88. 2000.

NESS, T.J.; GEBHART, G. F. Visceral pain: a review of experimental studies. **Pain**. v. 41, n. 2, p. 167-234. 1990.

NEWSHOLME, E. A.; BLOMSLRAND, E. Tryptophan 5-hydroxytryptamine and a possible explanation for central fatigue. In: **Fatigue: neural and muscular mechanisms - advances**

in medicine and biology. v. 20. Ed: Gandevia, S.C et al. New York: Plenum Press, p. 384-315. 1995.

NORTH, R. A.; EGAN, T. M. Actions and distributions of opioid peptides in peripheral tissues. **British Medical Bulletin**. v. 39, n. 1, p.71-75. 1983.

NOSAKA, T., et al. Influence of regular exercise on age-related changes in arterial elasticity: mechanistic insights from wall compositions in rat aorta. **Canadian Journal of Applied Physiology**. v. 22, n. 2, p. 204-212. 2003.

OATWAY, M. A.; CHEN, Y.; WEAVER, L. C. The 5-HT₃ receptor facilitates at-level mechanical allodynia following spinal cord injury. **Pain**. v. 110, n. 1, p. 259-268. 2004.

O'CONNOR, P.; CHIPKIN, R. E. Comparisons between warm and cold water swim stress in mice. **Life Sciences**. v. 35, n. 6, p. 631-639. 1984.

O'CONNOR, P. J.; COOK, D. B. Exercise and pain: the neurobiology, measurement, and laboratory study of pain in relation to exercise in humans. **Exercise and Sport Sciences Reviews**. v. 27, n. 1, p. 119-166. 1999.

OLAUSSON, B., et al. Effects of naloxone on dental pulp pain threshold following muscle exercise and low frequency transcutaneous nerve stimulation: a comparative study in man. **Acta Physiologica Scandinavica**. v. 126, n. 1, p. 299-305. 1986.

OLESSON, T. D.; TWOMBLY, D. A.; LIEBENSKIND, J. C. Effects of pain attenuating brain stimulation and morphine on electrical activity in the raphe nuclei of the awake rat. **Pain**. v. 4, n. 3, p. 211-230. 1978.

OSTROWSKI, K.; SCHJERLING, P.; PEDERSEN, B. K. Physical activity and plasma interleukin-6 in humans- effect of intensity of exercise. **European Journal of Applied Physiology**. v. 83, n. 6, p. 512-515. 2000.

OSTROWSKI, K., et al. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. **The Journal of Physiology**. v. 515, n. 1, p. 287-291. 1999.

PAN, Z. Z.; WESSENDORF, M. W.; WILLIAMS, J. T. Modulation by serotonin of the neurons in rat nucleus raphe magnus in vitro. **Neuroscience**. v. 54, n. 2, p. 421- 429. 1993.

PARDRIDGE, W. M.; CHOI, T. B. Neutral amino acid transport at the human blood-brain barrier. **Federation Proceedings**. v. 45, n. 7, p. 2073-2078. 1986.

PAUL, D., et al. 5-Hydroxytryptamine 3 (5-HT₃) receptors mediate spinal 5-HT antinociception: an antisense approach. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 298, n. 2, p. 674-678. 2001.

PEDERSEN, B. K.; FISCHER, C. P. Beneficial health effects of exercise – the role of IL-6 as a myokine. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 28, n. 4, p. 152-156. 2007.

PEDERSEN, B. K.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. **Physiological Reviews**. v. 80, n. 3, p. 1055-1081. 2000.

PIERCE, D.; KUPPART, I.; HARRY, D. Urinary epinephrine and norepinephrine levels in women athletes during training and competition. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**. v. 36, n. 1, p.1-6. 1979.

REN, K.; RANDICH, A.; GEBHART, G. F. Effects of electrical stimulation of vagal afferents on spinothalamic tract cells in the rat. **Pain**. v. 44, n. 3, p. 311-319. 1991.

REN, K., et al. Vagal afferent stimulation-produced effects on nociception in capsaicin-treated rats. **Journal of Neurophysiology**. v. 69, n. 5, p. 1530-1540. 1993.

RIBEIRO, R. A., et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**. v. 387, n. 1, p. 111-118. 2000.

ROSSI, L.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre exercício físico, fadiga e nutrição. **Revista Paulista de Educação Física**. v. 13, n. 1, p. 67-82. 1999.

ROSSI, L.; TIRAPEGUI, J. Implicações do sistema serotoninérgico no Exercício Físico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v. 48, n. 2, p. 227-233. 2004.

RODRIGUES, A. L., et al. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Sciences**. v. 70, n. 12, p. 1347-1358. 2002.

- ROSA, A. O., et al. Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide pathway in the antidepressant-like effects of zinc in mice. **Behavioural Brain Research**. v. 144, n. 1, p. 87-93. 2003.
- RUETER, L. L.; JACOBS, B. L. A microdialysis examination of serotonin release in the rat forebrain induced by behavioral/environmental manipulations. **Brain Research**. v. 739, n. 1, p. 57-69.1996.
- SANTOS, A. R. S., et al. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-N propyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 289, n. 1, p. 417-426. 1999.
- SANTOS, A. R. S., et al. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. **Neuropharmacology**. v. 48, n. 7, p. 1021-1034. 2005.
- SALMON, P. Effects of physical exercise on anxiety, depression, and sensitivity to stress: a unifying theory. **Clinical Psychology Review**. v. 21, n. 1, p. 33-61. 2001.
- SCHWARZ, L.; KINDERMANN, W. Changes in Beta-endorphin levels in response to aerobic and anaerobic exercise. **Sports Medicine**. v. 13, n. 1, p. 25-36. 1992.
- SEDAN, O.; SPRECHER, E.; YARNITSKY, D. Vagal stomach afferents inhibit somatic pain perception. **Pain**. v. 113, n. 3, p. 354-359. 2005.
- SGHERZA, A. L., et al. Effect of naloxone on perceived exertion and exercise capacity during maximal cycle ergometry. **Journal of Applied Physiology**. v. 93, n. 6, p. 2023-2028. 2002.
- SIEGMUND, E. A.; CADMUS, R. A.; LU, G. A. A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 95, n. 4, p. 729-731. 1957 a.
- SIEGMUND, E. A.; CADMUS, R. A.; LU, G. Screening analgesics, including aspirin-type compound, based upon the antagonism of chemically induced "writhing" in mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 199, n. 1, p. 184-193, 1957b.
- SMIDERLE, F. R., et al. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1-3), (1-6)- linked beta-glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. **European Journal of Pharmacology**. v. 597, n. 1, p. 86-91. 2008.

STARKIE, R., et al. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production in humans. **The FASEB Journal**. v. 17, n. 8, p. 884-886. 2003.

STEIN, C. **Opioids in pain control: basic and clinical aspects**. USA: Cambridge. 1999.

STEIN, C.; SCHÄFER, M.; MACHELSKA, H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. **Nature Medicine**. v. 9, n. 8, p. 1003-1008. 2003.

STEINMETZ, K. A.; POTTER, J. D. Vegetables, fruit, and cancer prevention: A review. **Journal of the American Dietetic Association**. v. 96, n. 10, p. 1027-1039. 1996.

STEVENSON, J. A., et al. Bouts of exercise and food intake in the rat. **Journal of Applied Physiology**. v. 21, n. 1, p. 118-122. 1966.

STEWART, T. M., et al. Ileitis modulates potassium and sodium currents in guinea pig dorsal root ganglia neurons. **The Journal of Physiology**. v. 552, n. 3, p. 797-807. 2003.

STRIGO, I. A., et al. Differentiation of visceral and cutaneous pain in the human brain. **Journal of Neurophysiology**. v. 89, n. 6, p. 3294-3303. 2003.

SUGIURA, T.; BIEFELDT, K.; GEBHART, G. F. TRPV1 function in mouse colon sensory neurons is enhanced by metabotropic 5-hydroxytryptamine receptor activation. **Journal of Neuroscience**. v. 24, n. 43, p. 9521-9530. 2004.

SUGIURA, T., et al. Acid-sensing properties in rat gastric sensory neurons from normal and ulcerated stomach. **Journal of Neuroscience**. v. 25, n. 10, p. 2617-2627. 2005.

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

TERMAN, G. W., et al. Intrinsic mechanisms of pain inhibition: activation by stress. **Science**. v. 14, n. 4680, p. 1270-1277. 1984.

THURSTON, C. L.; RANDICH, A. Electrical stimulation of the subdiaphragmatic vagus in rats: inhibition of heat-evoked responses of spinal dorsal horn neurons and central substrates mediating inhibition of the nociceptive tail flick reflex. **Pain**. v. 51, n. 3, p. 349-365. 1992.

TJØLSEN, A.; HOLE, K. Animal Models of Analgesia. In: Dickenson, A.; Besson, J. -M., ed. **The Pharmacology of Pain**. Verlag, Berlin: Springer. v. 130, n. 1, p. 1-20. 1997.

TRESCOT, A. M., et al. Opioid pharmacology. **Pain Physician**. v. 11, n. 2, p. 133- 153. 2008.

URHAUSEN, A., et al. Individual anaerobic threshold and maximum lactate steady state. **International Journal of Sports Medicine**. v. 14, n. 3, p. 134-139. 1993.

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

VAZ, Z. R., et al. Antinociceptive action of 2- (4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel Xanthoxyline derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 278, n. 1, p. 304-312. 1996.

VINEGAR, R., et al. Antagonism of pain and Hyperalgesia. Anti-inflammatory Drugs. In: Vane, JR, Ferreira, SH, ed. **Handbook of Experimental Pharmacology**. Verlag, Berlin: Springer. v. 50, n. 2, p. 208-222. 1979.

VIVEROS, O. H., et al. Opiate-like materials in the adrenal medulla: evidence for storage and secretion with catecholamines. **Molecular Pharmacology**. v. 16, n. 3, p. 1101-1108. 1979.

YIANGOU, Y., et al. Increased acid-sensing ion channel ASIC-3 in inflamed human intestine. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**. v. 13, n. 8, p. 891-896. 2001.

YOSHIMASA, T., et al. Methionine-enkephalin and leucine enkephalin in human sympathoadrenal system and pheochromocytoma. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 69, n. 3, p. 643-650. 1982.

YOSHIMURA, M.; FURUE, H. Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. **Journal of Pharmacological Sciences**. v. 101, n. 2, p. 107-117. 2006.

WEI, S., et al. Neuropeptide-processing carboxypeptidases. **Life Sciences**. v. 73, n. 6, p. 655-662. 2003.

WILLER, J. C.; DEHEN, H.; CAMBIER, J. Stress-induced analgesia in humans: endogenous opioids and naloxone-reversible depression of pain reflexes. **Sciences**. v. 212, n. 4495, p. 689-691. 1981.

WILLIS, W. D. Jr.; COGGESHALL, R. E. Ascending sensory tracts and their descending control. In: Willis W. D. Jr; Coggeshall R. E., ed. **Sensory mechanisms of the spinal cord**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; p. 857-881. 2004.

WILLIS, W. D., et al. A visceral pain pathway in the dorsal column of the spinal cord. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the Uites States of America**. v. 96, n. 14, p. 7675-7679. 1999.

WILLOW, M.; CARMODY, J.; CARROLL, P. The effects of swimming in mice on pain perception and sleeping time in response to hypnotic drugs. **Life Sciences**. v. 26, n. 3, p. 219-224. 1980.

WILSON, W. M.; MARSDEN, C. A. In vivo measurement of extracellular serotonin in the ventral hippocampus during treadmill running. **Behavioural Pharmacology**. v. 7, n.1. p. 101-104. 1996.

WRIGHT, A.; SLUKA, K. A. Nonpharmacological treatments for musculoskeletal pain. **The Clinical Journal of Pain**. v. 17, n. 1, p. 33-46. 2001.

WURTMAN, R. J.; FERNSTROM, J. F. Control of brain monoamine synthesis by diet and plasma amino acids. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 28, n. 6, p. 638-647. 1975.

WU, S., et al. Changes of the expression of 5-HT receptor subtype mRNAs in rat dorsal root ganglion by complete Freund's adjuvant-induced inflammation. **Neuroscience Letters**. v.307, n. 3, p. 183-186. 2001.

ZAGORODNYUK, V. P.; CHEN, B. N.; BROOKES, S. J. H. Intraganglionic laminar endings are mechano-transduction sites of vagal tension receptors in the guinea-pig stomach. **The Journal of Physiology**. v. 534, n. 1, p. 255-268. 2001.

ZAGORODNYUK, V. P., et al. Mechanotransduction by intraganglionic laminar endings of vagal tension receptors in the guinea-pig oesophagus. **The Journal of Physiology**. v. 553, n. 2, p. 575-587. 2003.

ZEITZ, K. P., et al. The 5-HT₃ subtype of serotonin receptor contributes to nociceptive processing via a novel subset of myelinated and unmyelinated nociceptors. **The Journal of Neuroscience**. v. 22, n. 3, p. 1010-1019. 2002.

ZHANG, Y. Q., et al. Expression of 5-HT_{1A} receptor mRNA in rat lumbar spinal dorsal horn neurons after peripheral inflammation. **Pain**. v. 98, n. 3, p. 287-295. 2002.

ZHOU, A., et al., Proteolytic processing in the secretory pathway. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 274, n. 30, p. 20745-20748. 1999.

ZHU, C. Z., et al. Assessing the role of metabotropic glutamate receptor 5 in multiple nociceptive modalities. **European Journal of Pharmacology**. v. 506, n. 2, p. 107-118. 2004.

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

ZÖLLNER, C., et al. Painful inflammation-induced increase in mu-opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons. **Molecular Pharmacology**. v. 64, n. 2, p. 202-210. 2003.